

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Methoden
des arbeitsmedizinisch-toxikologischen Laboratoriums

Diss. Erlangen
1983

von
Eberhard Schnödt
aus
Tremmersdorf



Aus dem Institut für Arbeits- und Sozial-Medizin
und der Poliklinik für Berufskrankheiten

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. H. Valentin

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Methoden des arbeitsmedizinisch-toxikologischen Laboratoriums

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Eberhard Schnödt

aus

Tremmersdorf

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. H. Valentin

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.1983

Herrn Prof. Dr. med. H. Valentin danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas
und seine Unterstützung während der Ent-
stehung dieser Arbeit.

Herrn Dipl.Chem. Dr. K. Göbler und Herrn
Dipl.Ing. K.H. Schaller sei für die hervor-
ragende Zusammenarbeit, die vielen wertvollen
Hinweise bei der Abfassung und eine nicht all-
tägliche Unterstützung bei allen Problemen be-
sonders herzlich gedankt.

Ebenfalls danken möchte ich allen Angestellten
des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit
beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	1
1. <u>Einleitung</u>	5
1.1. Durchführung des Biological Monitoring	11
1.1.1. Auswahl des Untersuchungsmaterials	12
1.1.2. Auswahl der Meßgröße	12
1.1.3. Auswahl der Analysemethoden	13
1.1.4. Beurteilungskriterien	15
1.2. Die Technik der HPLC und ihre Anwendung auf biologisches Material	16
1.2.1. Instrumentarium	16
1.2.2. Die Bedeutung der Probenaufarbeitung für die HPLC-Analyse	21
2. <u>Methodensammlung für quantitative HPLC-Bestimmungen im Urin</u>	43
2.1. <u>Bestimmung von Kreatinin im Urin</u>	43
2.1.1. Einleitung	43
2.1.2. Methodik	45
2.1.2.1. Prinzip des Verfahrens	45
2.1.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen	45
2.1.2.3. Probennahme und Probenlagerung	46
2.1.2.4. Arbeitsvorschrift	47
2.1.2.5. Eichung	47



2.1.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	49
2.1.3. Diskussion	49
2.2. <u>Bestimmung von Phenol im Urin</u>	57
2.2.1. Einleitung	57
2.2.2. Methodik	63
2.2.2.1. Prinzip des Verfahrens	63
2.2.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen	63
2.2.2.3. Probennahme und Probenlagerung	64
2.2.2.4. Arbeitsvorschrift	65
2.2.2.5. Eichung	66
2.2.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	66
2.2.3. Diskussion	67
2.3. <u>Direkte, differentielle Bestimmung von Hippursäure und Methyl-Hippursäure- Isomeren im Urin</u>	80
2.3.1. Einleitung	80
2.3.2. Methodik	86
2.3.2.1. Prinzip des Verfahrens	86
2.3.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen	91
2.3.2.3. Probennahme und Probenlagerung	92
2.3.2.4. Arbeitsvorschrift	92
2.3.2.5. Eichung	93
2.3.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	97
2.3.3. Diskussion	99

2.4.	<u>Quantitative Bestimmung der Styrol-Meta-</u> <u>boliten Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure</u> <u>im Urin</u>	104
2.4.1.	Einleitung	104
2.4.2.	Methodik	107
2.4.2.1.	Prinzip des Verfahrens	107
2.4.2.2.	Geräte, Chemikalien und Lösungen	108
2.4.2.3.	Probennahme und Probenlagerung	109
2.4.2.4.	Arbeitsvorschrift	110
2.4.2.5.	Eichung	112
2.4.2.6.	Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	112
2.4.3.	Diskussion	114
2.5.	<u>Quantitative Bestimmung von p-Aminophe-</u> <u>no1 und Anilin im Urin</u>	119
2.5.1.	Einleitung	119
2.5.2.	Methodik	123
2.5.2.1.	Prinzip des Verfahrens	123
2.5.2.2.	Geräte, Chemikalien und Lösungen	124
2.5.2.3.	Probennahme und Probenlagerung	125
2.5.2.4.	Arbeitsvorschrift	125
2.5.2.5.	Eichung	126
2.5.2.6.	Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	126
2.5.3.	Diskussion	128

	Seite
2.6. <u>Quantitative Bestimmung von 4,4'-Methylen-</u> <u>bis-(2-Chloranilin)(MOCA^R) im Urin</u>	135
2.6.1. Einleitung	135
2.6.2. Methodik	139
2.6.2.1. Prinzip des Verfahrens	139
2.6.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen	139
2.6.2.3. Probennahme und Probenlagerung	140
2.6.2.4. Arbeitsvorschrift	141
2.6.2.5. Eichung	142
2.6.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	142
2.6.3. Diskussion	142
2.7. <u>Bestimmung von Copro- und Uroporphyrin</u> <u>im Urin</u>	147
2.7.1. Einleitung	147
2.7.2. Methodik	151
2.7.2.1. Prinzip des Verfahrens	151
2.7.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen	151
2.7.2.3. Probennahme und Probenlagerung	152
2.7.2.4. Arbeitsvorschrift	153
2.7.2.5. Eichung	154
2.7.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode	155
2.7.3. Diskussion	156
3. Schlußfolgerungen	160
4. Literatur	163

Zusammenfassung

Im Rahmen der arbeitsmedizinischen Überwachung Fremd- oder Schadstoff-exponierter Personen ist es heute üblich, die Noxe oder seine Metaboliten zur Abschätzung der Exposition im biologischen Material zu bestimmen. Zur Erfüllung dieser Aufgabe steht dem arbeitsmedizinisch-toxikologischen Laboratorium eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Ein besonders leistungsstarkes und universelles Verfahren ist die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph besteht im wesentlichen aus einer Förderpumpe für die mobile Phase, einem Einspritzblock, einer chromatographischen Trennsäule und einem Detektionssystem. Für die biochemische Spurenanalytik sind die spektralphotometrischen, die fluorimetrischen und elektrochemischen Detektoren von Bedeutung.

Neben einer Darstellung der Analysentechnik wird insbesondere auf die Probenvorbereitung von biologischen Materialien eingegangen. Anschließend erfolgt eine Zusammenstellung der wichtigsten in unserem Institut praktizierten hochdruckflüssigkeitschromatographischen Arbeitsverfahren. Im einzelnen handelt es sich um die quantitative Bestimmung von Kreatinin, Phenol, Hippur-

säure und Methylhippursäure-Isomeren, Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure, p-Aminophenol und Anilin, 4,4'-Methylen-bis-(2-Chloranilin) sowie Copro- und Uroporphyrin.

Die Kreatininkonzentration im Urin wird häufig als Bezugsgröße bei der Untersuchung von Spontanharnproben verwendet um Diurese-bedingte Schwankungen zu berücksichtigen. Sie kann mit Hilfe der Reversed Phase-Chromatographie durch Direktinjektion verdünnter nativer Harnproben ermittelt werden. Das Verfahren besitzt einen Variationskoeffizienten von 3,1 %. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 mg/l Urin.

Die quantitative Bestimmung des Phenols im Urin dient als Indikator für eine Benzolexposition. Das Phenol wird durch Wasserdampfdestillation aus den Urinproben abgetrennt. Nach Reversed Phase-Chromatographie erfolgt eine photometrische oder fluorimetrische Detektion. Die Präzision in der Serie beträgt 5,6 %, die Nachweisgrenze 0,5 mg Phenol/l Urin.

Die wichtigsten Metaboliten der Lösemittel Toluol und Xylol im menschlichen Organismus sind die Hippursäure und die Methylhippursäuren. Nach Reversed Phase-Chromatographie der verdünnten Urinproben erfolgt die photometrische Detektion bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Als Variationskoeffizienten ergeben sich für

die Hippursäure-Bestimmung 8 %, für die Methylhippursäure-Analyse 9 %. Die Nachweisgrenzen liegen bei 10 mg Carbonsäure/l Urin.

Nach Styrol-Exposition werden als Hauptmetaboliten Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure im Harn ausgeschieden. Vor der Analyse muß die chemisch instabile Phenylglyoxilsäure durch oxidative Decarboxylierung in Benzoesäure umgewandelt werden. Für die hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung auf Reversed Phase-Material werden die entsprechenden Methylester mit Diazomethan hergestellt. Die Variationskoeffizienten betragen 4 bzw. 8,5 %. Die Nachweisgrenzen ermittelten sich zu 30 mg Mandelsäure/l Urin bzw. 10 mg Phenylglyoxilsäure/l Urin.

Eine berufliche Exposition gegenüber Anilin ist durch den Nachweis des Anilins bzw. seines Metaboliten p-Aminophenol im Urin möglich. Die beiden Substanzen werden durch Extraktion von der Urinmatrix abgetrennt und mit Reversed Phase-Chromatographie getrennt. Die Variationskoeffizienten sind 1,6 % für Anilin und 3,8 % für p-Aminophenol. Als Nachweisgrenze gilt ein Wert von 15 mg/l Urin.

4,4'-Methylen-bis-(2-Chloranilin) (MOCA^R) wird ohne Metabolisierung renal ausgeschieden. Für die Reversed Phase-Chromatographie wird MOCA^R säulenchromatogra-

phisch von den Harnbestandteilen abgetrennt und angereichert. Der Variationskoeffizient der Methode liegt bei 11 %, die Nachweisgrenze bei 15 µg MOCA^R/l Urin.

Zur Bestimmung des Copro- und Uroporphyrinspiegels werden die Substanzen durch Adsorption an Talkumpulver von der Urinmatrix abgetrennt. Die entsprechenden Methyl ester der Porphyrine werden nach Adsorptionschromatographie auf Kieselgel fluorimetrisch nachgewiesen. Die Präzision in der Serie beträgt 7 %, die Nachweisgrenzen liegen bei 2 µg Coproporphyrin/l bzw. 4 µg Uroporphyrin/l Urin.

Methodische Entwicklungen, vor allem bei den Detektionssystemen und der Automation werden die Einsatzmöglichkeiten der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie in der Zukunft noch intensivieren und erweitern.

1. EINLEITUNG

Die moderne Arbeitsmedizin hat vorwiegend präventiv-medizinische Aufgaben zu erfüllen. Im Rahmen der sozialen Sicherung sind Gesundheitsrisiken aufzuzeigen und präventive Maßnahmen zu ergreifen.

In unserer Industriegesellschaft ist der Arbeitnehmer vielfältigen Gefährdungen der Gesundheit durch chemische Noxen ausgesetzt. Generell stehen hierbei akute und subakute Schäden, mittelfristige Auswirkungen und Spätmanifestationen, wie chronische Intoxikationen einschließlich Kanzerogenität zur Diskussion (VALENTIN 1982). Maßgeblich sind die Natur des Fremd- oder Schadstoffes, die Art und Intensität der Einwirkung und der belastende Zeitraum sowie die pathophysiologischen Mechanismen. Bezüglich der Einzelheiten sei insbesondere auf die einschlägige Literatur über die medizinische Begutachtung exogen verursachter Gesundheitsschäden verwiesen (MARX 1981, GOETZ und RAUSCHENBACH 1973, SCHÖNBERGER et al. 1981).

Mit der Erarbeitung der Berufsgenossenschaftlichen Grundsätze (G-Sätze) für arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen durch den Ausschuß Arbeitsmedizin beim Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften wurde ein geeignetes Instrument geschaffen, der Forderung der Prävention nachzukommen. Bisher sind insgesamt

38 G-Sätze publiziert worden. Nach FRIEDEL (1981) wurden von hierzu ermächtigten Ärzten im Jahre 1980 mehr als 1,2 Mio spezielle arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen durchgeführt.

Durch Messungen bestimmter biochemischer Parameter sind die Belastungen des Menschen objektivierbar und quantifizierbar geworden. In diesem Zusammenhang ist das Konzept des "biological monitoring" oder "human monitoring" allgemein anerkannt (VALENTIN et al. 1979).

Die Analyse im biologischen Material stellt dabei ein direktes Verfahren zur Feststellung der effektiven Exposition über die verschiedenen Aufnahmewege dar. Man macht sich dabei die Möglichkeit zunutze, den Fremd- und Schadstoff, seine Metaboliten oder seine Wirkungen im exponierten Organismus selbst bzw. in dem von ihm stammenden biologischen Material zu bestimmen. Je nach Art des Schadstoffs und der Herkunft des biologischen Materials können diese Meßergebnisse häufig als Indikator für die Exposition des Organismus verwendet werden. Bisweilen bestehen aber auch Beziehungen dieser Indikatoren zu der gesamten Fremd- oder Schadstoffmenge im Organismus oder der Konzentration in einem kritischen Organ.

Zur qualitativen und quantitativen Erfassung der verschiedenen Noxen und zur Beurteilung des biochemischen

Verhaltens toxischer Substanzen steht den arbeitsmedizinisch-toxikologischen Laboratorien eine breite Palette an Methoden zu Verfügung. Hinweise auf Untersuchungsmethoden bei Einwirkung gesundheitsgefährdender Arbeitsstoffe wurden bereits in früheren Arbeiten gegeben (VALENTIN et al. 1968, 1972, 1979, SCHALLER et al. 1980).

Die Entwicklung der modernen Analytik geht heute dahin, das arbeitsmedizinisch-toxikologische Laboratorium mit chromatographischen und spektroskopischen Verfahren auszurüsten. Dabei müssen die verwendeten Methoden die Kriterien der analytischen Zuverlässigkeit und Praktikabilität erfüllen; d.h. sie müssen auf ihre Spezifität, Präzision und Richtigkeit überprüft sein. Besondere Bedeutung hat das Kriterium der Nachweisgrenze, da der Fremd- oder Schadstoff oder seine Metaboliten in nur geringen Konzentrationen im Organismus vorliegen.

Als besonders leistungsstarkes und universelles Verfahren hat sich die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie in den letzten Jahren erwiesen. Sie ermöglicht es beim jetzigen technischen Stand zuverlässige und praktikable Analysen im biologischen Material durchzuführen. Dieser Entwicklung trägt die nationale und internationale Literatur in den letzten Jahren Rechnung. Von 1974 bis 1980 hat die Zahl der Publikationen, welche sich mit der HPLC-Analyse im biologischen Material

befaßt, exponentiell zugenommen. Dies zeigt eine graphische Darstellung, deren Datenmaterial der Literatursammlung "Current Contents" entnommen wurde (Abb. 1).

In der vorliegenden Arbeit sind hochdruckflüssigkeitschromatographische Meßmethoden für das arbeitsmedizinisch-toxikologische Laboratorium gesammelt und dargestellt. Nach einer kurzen Erläuterung der Technik der HPLC und analytischen Hinweisen zur Probenvorbereitung werden neu erarbeitete und überprüfte Analysenvorschriften zur Bestimmung arbeitsmedizinisch wichtiger Substanzen im biologischen Material vorgestellt. In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit behandelten Substanzen mit den entsprechenden G-Sätzen aufgeführt. Ebenfalls enthalten sind in dieser Tabelle die maximalen Arbeitsplatz-Konzentrationen (MAK-Liste 1982) und zusätzlich finden sich Angaben zu oberen Normgrenzen bei Stoffen, die bereits physiologischerweise im Harn vorkommen.

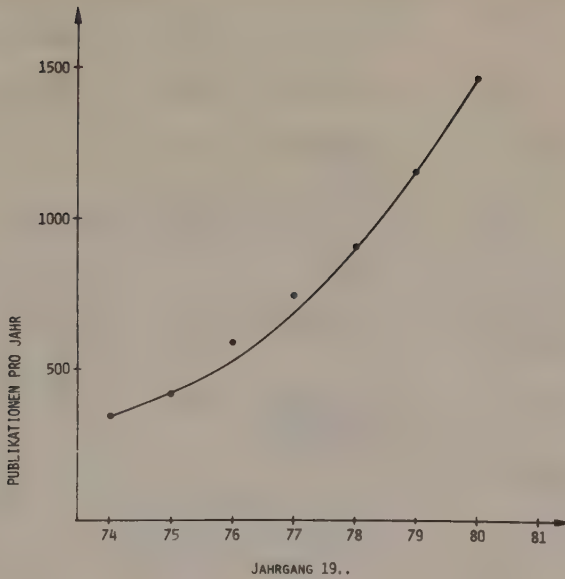


Abbildung 1: Graphische Darstellung der jährlichen Zunahme der HPLC-Arbeiten, welche sich mit der Analyse im biologischen Material befassen (Das Zahlenmaterial wurde aus den "Current Contents" 1975 - 1980 entnommen)

BG-Grundsatz TRgA	erforderliche und/oder er- wünschte Untersuchungen	Meßgröße Metabolit	Untersuchungs- material	obere Normgrenze	MAK-Werte mg/m ³
G 8	Benzol	Phenol	Urin	15 mg Phenol/l	* 26
G 29	Toluol	Hippursäure	Urin	1400 mg HA/l	750
	Xylol	Methylhippur- säure	Urin	-	870
./.	Styrol	Mandelsäure	Urin	-	420
		Phenylglyoxil- säure	Urin	-	
G 33	Anilin	p-Aminophenol	Urin	10 mg/l	8
./.	MOCA	./.	Urin	./.	./.
G 3	Blei	Uroporphyrin Koproporphyrin	Urin	0,07 mg/l	0,1

* TRK-Werte mg/m³

Tabelle 1: Arbeitsmedizinisch relevante Substanzen, die in den
BG-Grundsätzen enthalten sind

1.1.. Durchführung des Biological Monitoring

SCHIELE (1978) hat für das Biological Monitoring folgende umfassende Definition gegeben:

"Indirekte Feststellung der Exposition gegenüber chemischen Stoffen durch die Messung dieser Einflüsse und/oder ihrer Wirkungen (Indikatoren) in repräsentativem biologischen Material (Indikator-Medien)".

Abbildung 2 ergibt einen Überblick über das grundsätzliche Vorgehen bei der Durchführung des Biological Monitoring.

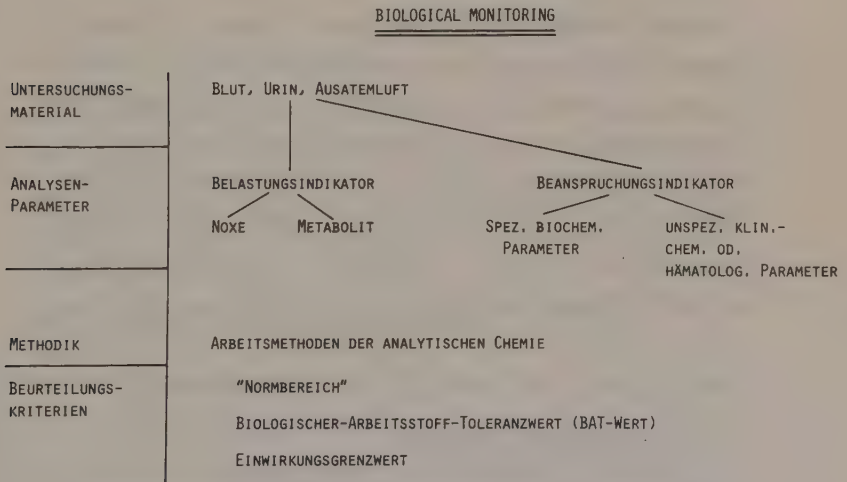


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Biological Monitoring

1.1.1. Auswahl des Untersuchungsmaterials

Unter "repräsentativem biologischen Material" ist das Probenmaterial (Indikator-Medium) zu verstehen, das sich zur Messung der Indikatoren in Form des Fremd- oder Schadstoffs, seiner Metaboliten oder seiner Wirkungen eignet.

Die Auswahl des Indikatormediums hängt von der jeweiligen Fragestellung, den analytischen Gegebenheiten und der Erhältlichkeit des Probenmaterials ab. Was untersucht werden muß und analysiert werden kann, hat sich im Einzelfall nach der betreffenden Substanz, ihrer Toxikokinetik und ihren Wirkungen zu richten. Als Untersuchungsmaterial von lebenden Menschen sind in erster Linie Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin erhältlich. Außerdem wird vereinzelt die Ausatemluft untersucht. Ein entscheidendes Kriterium bei der Gewinnung des Probenmaterials ist die Zumutbarkeit gegenüber dem Patienten. Die Tests dürfen in keinem Fall Gesundheitsrisiken mit sich bringen und sollen für die Probanden nicht belastend sein.

1.1.2. Auswahl der Meßgröße

Auch die Wahl des Indikators, des Analysenparameters, ist von der jeweiligen Fragestellung und den Eigenschaften der betreffenden Noxe abhängig. Generell können so-

wohl der Fremd- oder Schadstoff selbst, seine Metaboliten oder seine Wirkungen Indikatoren der Exposition sein. Die Erfassung des Schadstoffs selbst und zumeist auch die seiner Metaboliten sind die spezifischen Zeichen der Exposition (Belastungs-Indikator).

Die Empfindlichkeit und Spezifität der als Indikatoren gemessenen Wirkungen können dagegen sehr unterschiedlich sein. Für das Biological Monitoring geeignet sind nur solche Wirkungen, die vor manifesten Vergiftungserscheinungen auftreten und irreversibel sind (Beanspruchungsindikator).

Ein weiteres Auswahlkriterium für die Meßgröße ist, daß die Untersuchungen von Seiten der Probanden oder des medizinischen sowie des Laborpersonals keinen übermäßigen Zeitaufwand erfordern und im Hinblick auf Material, Ausstattung und Personal keine überhöhten Kosten verursachen.

1.1.3. Auswahl der Analysenmethoden

Das arbeitsmedizinisch-toxikologische Laboratorium verfügt heute über eine breite Palette von Methoden zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Schadstoffen und zur Beurteilung des biochemischen Verhaltens toxischer Substanzen. Eine Zusammenstellung der verschiedenen angewandten Analysenverfahren findet sich

in der Ringbuchsammlung "Analysen im biologischen Material" der Senatskommission für gefährliche Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Verlag Chemie Weinheim HENSCHLER 1978) und bei SCHALLER et al. (1979 und 1982). In diesen Publikationen werden auch Hinweise über die Art, die Gewinnung, die Menge, den Transport und die Lagerung der Proben gegeben.

Die Problemstellungen des arbeitsmedizinischen Laboratoriums decken sich weitgehend mit denen der analytischen Chemie. Die Entwicklung geht heute dahin, das arbeitsmedizinisch-toxikologische Laboratorium in Bereichen der molekularen und atomaren Spektrometrie und der Chromatographie zu instrumentieren. Die verwendeten Analysenmethoden müssen auf ihre analytischen Zuverlässigkeitskriterien, wie Spezifität, Präzision und Richtigkeit überprüft sein. Besondere Bedeutung hat in der Gewerbetoxikologie das Kriterium der Nachweisgrenze. Normalerweise kommt der Fremd- oder Schadstoff nicht oder nur in äußerst geringen Konzentrationen im Organismus vor. Erst das Erreichen der erforderlichen Nachweisgrenzen für viele Fremd- oder Schadstoffe durch die Einführung neuer analytischer Verfahren ermöglichte es dem Arbeitsmediziner, seinen präventivmedizinischen Aufgabenstellungen ausreichend nachzukommen.

1.1.4. Beurteilungskriterien

Bei der Bewertung und Interpretation von Analysenergebnissen im arbeitsmedizinischen Bereich muß die fachspezifische Problematik berücksichtigt werden. Dies dokumentiert sich durch die Einführung eines arbeitsmedizinisch tolerierbaren Grenzwertes für den Fremd- oder Schadstoff im biologischen Material. Im angelsächsischen Sprachraum wird hier im allgemeinen von "Biological Permissible Limits" gesprochen. In der Bundesrepublik Deutschland verwendet man hierfür neuerdings analog zum MAK-Wert den BAT-Wert (Biologischer Arbeitsstoff Toleranz-Wert). Er wird von einer Arbeitsgruppe der Senatskommission für gefährliche Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft erarbeitet. Folgende Definition liegt ihm zugrunde:

"Der BAT-Wert (Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert) ist die beim Menschen höchstzulässige Quantität eines Arbeitsstoffes bzw. Arbeitsstoffmetaboliten oder die dadurch ausgelöste Abweichung eines biologischen Indikators von seiner Norm, die nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnis im allgemeinen die Gesundheit der Beschäftigten auch dann nicht beeinträchtigt, wenn sie durch Einflüsse des Arbeitsplatzes regelhaft erzielt wird. Wie bei den MAK-Werten wird in der Regel eine maximale Arbeitsstoffbelastung von 8 Stunden täglich und 40 Stun-

den wöchentlich zugrundegelegt. BAT-Werte können als Konzentrationen, Bildungs- oder Ausscheidungsraten (Menge/Zeiteinheit) definiert sein. BAT-Werte sind als Höchstwerte für gesunde Einzelpersonen konzipiert. Sie werden unter Berücksichtigung der Wirkungscharakteristika der Arbeitsstoffe und einer angemessenen Sicherheitsspanne in der Regel für Blut und/oder Harn aufgestellt. Maßgebend sind dabei arbeitsmedizinisch-toxikologisch fundierte Kriterien des Gesundheitsschutzes".

Eine ausführliche Darstellung dieses Konzeptes zur Individualprävention bei Exposition gegenüber gesundheitsschädlichen Arbeitsstoffen findet sich bei LEHNERT (1980). Die evaluierten BAT-Werte werden in der in jedem Jahr von der DFG herausgegebenen MAK-Wert-Liste veröffentlicht.

1.2. Die Technik der HPLC und ihre Anwendung auf biologisches Material

1.2.1. Instrumentarium

Die Bezeichnung Chromatographie wird für Trenntechniken angewandt, welche auf der Verteilung einer Substanz zwischen einer bewegten mobilen Phase und einer festen stationären Phase beruhen. Die mobile Phase kann ein Gas oder eine Flüssigkeit, die stationäre Phase entweder eine Flüssigkeit oder ein Festkörper sein.

Die bekanntesten Chromatographiearten sind die Gas-, die Papier- und Dünnschicht- sowie die Flüssigkeitschromatographie. Im vorliegenden Beitrag wird die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC), eine wichtige Variante der Flüssigkeits-Chromatographie, beschrieben. Als weitere Bezeichnungen für diese Analysetechnik liest man noch im Englischen "High Pressure Liquid Chromatography" und "High Speed Liquid Chromatography". Die moderne Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie unterscheidet sich durch folgende Merkmale von der klassischen Flüssigkeits-Chromatographie:

1. Die Säulen besitzen kleine Innendurchmesser (2 bis 10 mm).
2. Es werden Säulenfüllmaterialien mit sehr kleinen Partikeldurchmessern (1 bis 50 μm) verwendet.
3. Man arbeitet mit relativ hohen Eingangsdrücken zwischen 50 und 400 bar.
4. Die Probenvolumina bewegen sich im Mikroliter-Bereich.
5. Es müssen kontinuierlich arbeitende Detektorsysteme mit hoher Nachweisempfindlichkeit eingesetzt werden.
6. Die Systeme lassen sich vollautomatisieren.

7. Die Analysenzeiten sind relativ kurz.

8. Es wird eine sehr hohe Peakauflösung gefordert.

Grundsätzlich beruht der Trennprozeß in der Flüssigkeits-Chromatographie auf Wechselwirkungen des in der mobilen Phase gelösten Analyten mit der stationären Phase.

Während des Chromatographie-Vorganges werden die Moleküle des Analyten von der stationären Phase zurückgehalten (retardiert). Die Größe dieser Wechselwirkung ist abhängig von der Art der mobilen und der stationären Phase und von der individuellen chemischen Struktur des Analyten. Die Retardation einer Probenkomponente ist selektiv. Dies bedeutet, daß mit einem vorgegebenen System aus mobiler und stationärer Phase die Größe der Wechselwirkungen für jede Probenkomponente unterschiedlich sein wird. Hieraus ergeben sich die verschiedenen Retentionszeiten und damit eine chromatographische Trennung. Die Trennprinzipien der Flüssigkeits-Chromatographie ergeben sich im wesentlichen aus der Adsorptions-, der Verteilungs-, der Ionenaustauscher- und der Gel-Filtrations-Chromatographie. Für die Routineanalytik haben sich die Adsorptions- und insbesondere die Reversed-Phase-Chromatographie bewährt.

Die Abbildung 3 zeigt schematisch die funktionellen Teile einer HPLC-Apparatur. Die Hauptkomponenten sind:

1. ein Lösemittel-Reservoir

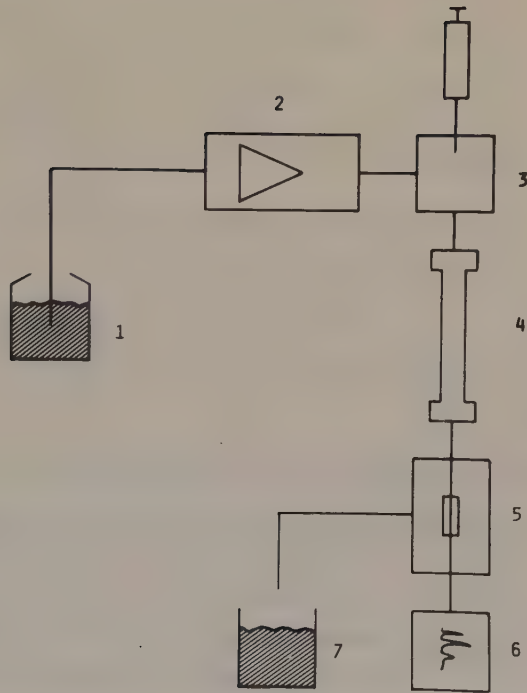


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer HPLC-Apparatur

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1: Lösemittel-Reservoir | 6: Schreiber und/
oder Integrator |
| 2: Pumpe | |
| 3: Einspritzblock | 7: Auffangbehälter
für Eluenten oder
Fraktionensammler |
| 4: Trennsäule | |
| 5: Detektor mit Durch-
flußzelle | |

2. eine Pumpe zur Förderung der mobilen Phase
3. ein Einspritzblock, um die Probe in das System zu injizieren
4. eine Säule, welche das Trennmateriäl enthält
5. ein Detektor, verbunden mit einem Schreiber, um eine qualitative und quantitative Auswertung zu ermöglichen
6. ggf. ein Fraktionensammler, um die unzerstört detektierten Substanzen aufzufangen.

Auf die apparativen Einzelheiten von Pumpen-, Injektions- und Säulensystemen soll hier nicht näher eingegangen werden.

Die vier häufigsten Detektortypen in der HPLC sind der Brechungsindex-Detektor, der spektralphotometrische Detektor, der Fluoreszenz-Detektor und der elektrochemische Detektor. Alle diese Detektortypen haben eine Durchflußzelle, welche im "On Line"-Betrieb kontinuierlich arbeitet. Für die biochemische Spurenanalytik sind lediglich die spektralphotometrischen, fluorimetrischen und elektrochemischen Detektoren von Bedeutung.

Ausführliche Erläuterungen über die HPLC sind den Büchern zu entnehmen von:

Engelhardt (1975)

Johnson und Stevenson (1978)

Kaiser und Oelrich (1979)

Kakac und Vejdelek (1974)

Meyer (1979)

Snyder und Kirkland (1974)

1.2.2. Die Bedeutung der Probenaufarbeitung für die HPLC-Analyse

Bei der Entwicklung einer hochdruckflüssigkeitschromatographischen Methode ist aufgrund unserer Erfahrungen nach folgendem Schema vorzugehen:

1. Festlegung der zu verwendenden Trenntechnik anhand der chemischen Eigenschaften der nachzuweisenden Substanzen. Dabei müssen die geforderten Qualitätsmerkmale wie Nachweisgrenzen, Präzision usw. und die Art der Probe realistisch berücksichtigt werden.
2. Erstellung einer chromatographischen Trennung mit Standardproben.
3. Optimierung der chromatographischen Parameter wie mobile Phase, Flußrate, Wellenlängen usw.
4. Ermittlung der Nachweisgrenzen. Rechnerische Abschätzung, ob die Empfindlichkeit des Detektorsystems der gestellten Analysenaufgabe genügt.

5. Einführung einer geeigneten Probenaufarbeitung und Kopplung mit dem chromatographischen System.
6. Optimierung aller Probenaufarbeitungsschritte unter besonderer Berücksichtigung von Matrixeffekten.
7. Ermittlung der analytischen Zuverlässigkeitskriterien.

Die Entwicklung guter Trennungen mit Standardsubstanzen bringt meist keine großen Probleme mit sich. Dies dokumentiert sich auch in zahlreichen Veröffentlichungen. Meist wird nur die chromatographische Trennung dargestellt und nicht die Probleme der Probenvorbereitung erwähnt. Das hat zur Folge, daß bei der Erarbeitung von Methoden für den routinemäßigen Einsatz erneut Trennprobleme auftreten. Folgende Gründe machen eine Probenaufarbeitung erforderlich:

1. Die Probe muß in eine injektionsfähige Form überführt werden.
2. Die zu bestimmende Substanz sollte möglichst angereichert werden.
3. Der Analyt muß isoliert bzw. die störende Matrix entfernt werden.

Zu 1.

Das Probenmaterial muß vor der HPLC-Analyse bis auf we-

nige Ausnahmen in eine injektionsfähige Form überführt werden. Dabei soll das Proben-Lösemittel mit der mobilen Phase identisch oder ihr zumindest ähnlich sein. In jedem Fall muß das Proben-Lösungsmittel mit der mobilen Phase mischbar sein. Dies bedeutet, daß sich unpolare Lösungsmittel für die Adsorptionschromatographie eignen. Polare Lösungsmittel wie zum Beispiel wässrige oder alkoholische Lösungen werden vor allem für die Reversed Phase Chromatographie zum Lösen des Probenmaterials eingesetzt. Die Polarität der injizierten Lösung darf möglichst keine stärkere Elutionskraft als die mobile Phase selbst besitzen. Andernfalls können, insbesondere bei Injektion größerer Probenvolumina, am Säulenkopf adsorbierte Substanzen desorbiert und eluiert werden. Diese Peaks treten dann im Chromatogramm als sogenannte "Memory- oder Geister-Peaks" auf. In der Adsorptionschromatographie ist es z.B. nicht möglich, das Probenmaterial in polaren Lösemitteln aufzunehmen. Umgekehrt darf bei der Reversed Phase Chromatographie nur ein polares Lösemittel für die Injektion benutzt werden. Gegebenenfalls sind Lösungen einzudampfen und in mobiler Phase wieder aufzunehmen. Feste Proben werden in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen, biologisches Material wie Gewebe, Blut usw. sind aufzuschließen.

Die injizierten Lösungen müssen partikelfrei sein, um

Verunreinigungen von Spritzen, Einspritzblock und Säule zu vermeiden. Unter Umständen ist eine Mikrofiltration vorzunehmen. Systeme hierfür sind auch für kleinste Probenvolumina kommerziell erhältlich.

Zu 2.

Der Grund für eine oft relativ aufwendige Probenaufarbeitung ist die notwendige Anreicherung der nachzuweisenden Substanzen. Hierbei wird versucht, eine relativ große Menge Probenmaterial aufzuarbeiten und den Analyten in eine möglichst konzentrierte, injektionsfähige Lösung zu überführen. In vielen Fällen läßt sich die Menge des einzusetzenden Probenmaterials aus der zu erwartenden Konzentration und der vorgegebenen Nachweisgrenze des Detektionssystems abschätzen.

Zu 3.

Standardsubstanzen lassen sich oft ohne Schwierigkeiten chromatographisch gut trennen. Überträgt man diese Trennungen auf die zu untersuchenden Substanzlösungen, so stellt sich heraus, daß Störpeaks aus der Matrix in das Chromatogramm gelangt sind. Es sollte daher eine Isolierung der nachzuweisenden Substanz von der störenden Matrix angestrebt werden. Die Spezifität einer Analysenmethode wird durch eine substanzorientierte Probenaufarbeitung erhöht.

Im folgenden soll eine Zusammenstellung von Probenaufarbeitungsmöglichkeiten als Vorstufe der HPLC-Analyse gegeben werden. In der organischen und anorganischen Chemie, Biochemie, pharmazeutischen Chemie, Pharmakologie, klinischen Chemie und Toxikologie werden recht verschiedenartige Anforderungen an die Probenvorbereitung und die chromatographische Analytik gestellt. In der arbeitsmedizinischen Toxikologie hat man die HPLC zur Untersuchung biologischer Körperflüssigkeiten oder zuweilen auch von Gewebeproben eingesetzt. Die aufgeführten Lösungsvorschläge zur Probenvorbereitung ergeben sich aus diesem Arbeitsgebiet. Die Beispiele sind jedoch allgemein gültig und sind auch auf andere Disziplinen übertragbar. Ähnliche Aufarbeitungsprobleme gelten auch für die Niederdruck-Flüssigkeits-, die Gas- und die Dünnschicht-Chromatographie.

Die Probenaufarbeitung kann aus einer Direktinjektion, Filtration oder Zentrifugation, Extraktion, Proteinfällung, chemischen Reaktionen oder relativ aufwendigen Vorreinigungsschritten, z.B. chromatographischer Art, bestehen (Tab. 2).

In der klinischen Chemie können HPLC-Analysen durch Direktinjektion von meist verdünnten Urin-, Liquor-, Speichel-, Fruchtwasserproben usw. ausgeführt werden. Die Lebensdauer der Säulen wird in diesen Fällen durch

1. DIREKTINJEKTION
2. VERDONNUNG UND EINENGEN
3. LÖSEN
4. EXTRAKTION
5. FÄLLUNG
6. FILTRATION
7. ZENTRIFUGATION
8. DESTILLATION
9. CHROMATOGRAPHIE
10. CHEMISCHE REAKTION VOR UND NACH DER SÄULE

Tabelle 2: Auflistung einiger Möglichkeiten für die
Probenvorbereitung

den Proteingehalt des Probenmaterials verkürzt. Dies gilt vor allem für Plasma oder Serum. Es sind jedoch Beispiele bekannt, in denen bis zu 50 Direktinjektionen von Plasma auf Reversed Phase-Säulen ausgeführt wurden (LANGER 1980). Insbesondere beim Einsatz von selbstgepackten HPLC-Säulen ist ein solches Verfahren oft zeit- und materialsparender als eine aufwendige Probenvorbereitung.

In der arbeitsmedizinischen Praxis hat sich die Direktinjektion verdünnter Urinproben zur Bestimmung der Hippursäure und der o-, m- und p-Methylhippursäuren im Urin bewährt (GOSSLER et al. 1980, vgl. auch Kap. 2.3., S. 80).

Ein Verdünnen des Probenmaterials ist notwendig, wenn in den Lösungen zu hohe Substanzkonzentrationen vorliegen. Injektionen hoher Probenmengen können ein Überladen der Säule bewirken oder den Detektor außerhalb des Geltungsbereichs des Nernst'schen Satzes im nicht linearen Bereich arbeiten lassen. Aus den aufgeführten Gründen ist es in den meisten Fällen zweckmäßig, Verdünnungen des Probenmaterials mit der mobilen Phase vorzunehmen. Ein praktisches Beispiel für eine notwendige Verdünnung stellt die Bestimmung des Kreatinins im Urin dar (vgl. Kap. 2.1., S. 43).

Das Einengen flüssiger Proben verbessert im Allgemeinen

die Nachweisgrenzen. Hierdurch wird ungeeignetes Lösemittel entfernt. Dieses Vorgehen kann bei organischen Substanzen leicht eine Zerstörung bewirken. Problematisch erweist sich auch die Wiederaufnahme der zur Trockenen eingeeengten Lösungen, da sich an den Glaswandungen nicht wiederauflösbare Rückstände gebildet haben.

Gefriertrocknungen sind schonend und reproduzierbar auszuführen. Schwierigkeiten ergeben sich bei der Entfernung organischer Lösemittel. Die meisten Gefriertrocknungsapparaturen sind hierfür nicht geeignet.

Ein häufig ausgeführter Probenaufarbeitungsgang ist die Auflösung des Probenmaterials. Es kann eine Probe entweder vollständig aufgelöst werden oder durch Wahl eines geeigneten Lösemittels selektiv eine bestimmte chemische Verbindung isoliert werden. Dieser Arbeitsschritt wird am geeignetsten in einer sogenannten Soxhlet-Apparatur ausgeführt (Fest-Flüssig-Extraktion). Ein Auflösen fester Proben durch saure und alkalische Aufschlüsse ist in den seltensten Fällen anwendbar, da durch eine solche Behandlung die organischen Substanzen zumeist zerstört werden.

Extraktionen sind die am häufigsten eingesetzten Probenvorbereitungsschritte. Flüssig-Flüssig-Extraktionen werden im Scheidetrichter, aber auch in Zentrifugenröhrchen

aus Glas oder Kunststoff ausgeführt. Eine kontinuierliche Extraktion kann man in dem Perforator nach Kutscher-Steudel vornehmen.

Bei Extraktionsvorgängen wird der Analytiker die chemischen Eigenschaften der Lösungsmittel und die darin zu lösenden Substanzen ausnützen. Organische Säuren gehen zum Beispiel bei niedrigen pH-Werten in die organische Phase über, im Alkalischen verbleiben sie im wässerigen Milieu. Umgekehrtes gilt für die organischen Basen. Bei neutralen Stoffen liegt das Verteilungsgleichgewicht auf der Seite der organischen Lösungsmittel.

Schwierig zu extrahieren sind Substanzen mit amphoterem Charakter. In solchen Fällen kann die sogenannte Ionenpaarextraktion die Polarität der Verbindungen ändern und sie in extrahierbare Formen überführen.

Bei vielen Methoden läßt sich durch sukzessives Ändern der pH-Werte eine selektive Extraktion vornehmen. Spontane Änderungen der pH-Werte setzt man bei den sogenannten Reextraktionen ein. Mit diesen lassen sich zum Einen störende Matrixeffekte entfernen, zum Anderen Anreicherungen ausführen. Als ein Beispiel sei hier die hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung der Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure im Urin aufgeführt (WILL et al. 1980, vgl. Kap. 2.4., S.104). In Abbildung 4 ist das Chromatogramm der aufgearbeiteten Urinprobe eines

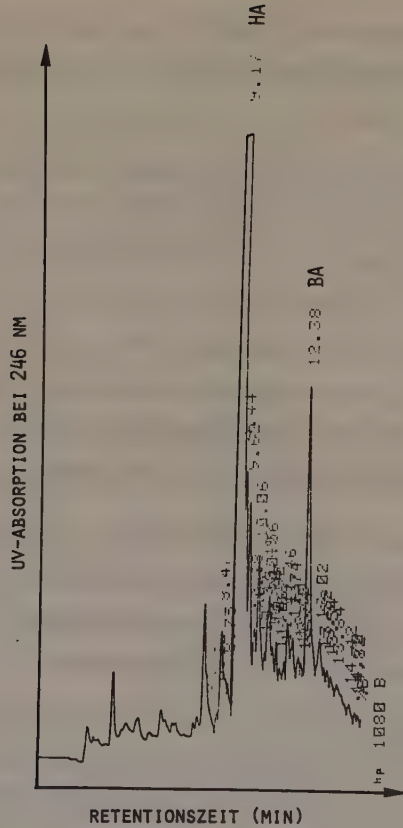
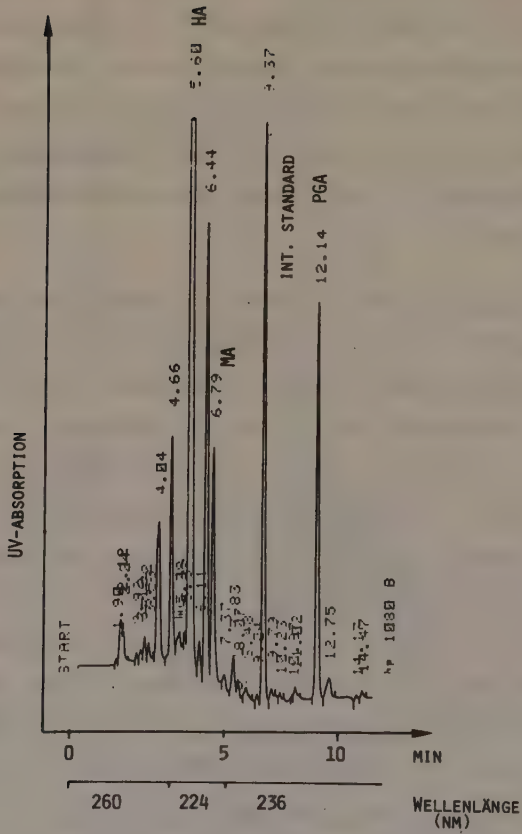


Abbildung 4: Chromatogramm der Urinprobe eines Styrol-belasteten Arbeiters. Die Urinprobe wurde ohne Reextraktion aufgearbeitet

Styrol-belasteten Arbeiters zu sehen. Bei der Aufarbeitung dieser Probe wurde die Reextraktion weggelassen. Das Chromatogramm derselben Urinprobe unter Einschaltung einer Reextraktion ist in Abbildung 5 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß gute chromatographische Trennungen mit zusätzlichem Reextraktionsschritt erhalten werden.

Fällungsreaktionen sind besonders zur Entfernung von Eiweiß aus Blut, Plasma, Gewebehomogenaten usw. geeignet. Eiweißfällungen erfolgen am häufigsten durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln, wie Aceton, Acetonitril, Alkohole usw. oder durch starke Säuren, wie Perchlorsäure, Trifluoressigsäure, Salpetersäure, Trichloressigsäure usw. Auch durch Zugabe von Schwermetallsalzen zum Probenmaterial kann dies erreicht werden. Nach der Eiweißfällung ist eine intensive Zentrifugation notwendig. Die erhaltenen klaren Überstände können häufig direkt in das hochdruckflüssigkeitschromatographische System injiziert werden. Ein typisches Beispiel ist die Bestimmung von Chloramphenicol in Serum, Liquor oder Eiterproben (TRIEBIG et al. 1979, GOSSLER et al. 1981). Zur Probenvorbereitung wird das Material mit Perchlorsäure versetzt, zentrifugiert und die klaren Überstände für die Chromatographie eingesetzt (Chromatographiebedingungen vgl. Legenden zu Abbildung 6 und Abbildung 7).



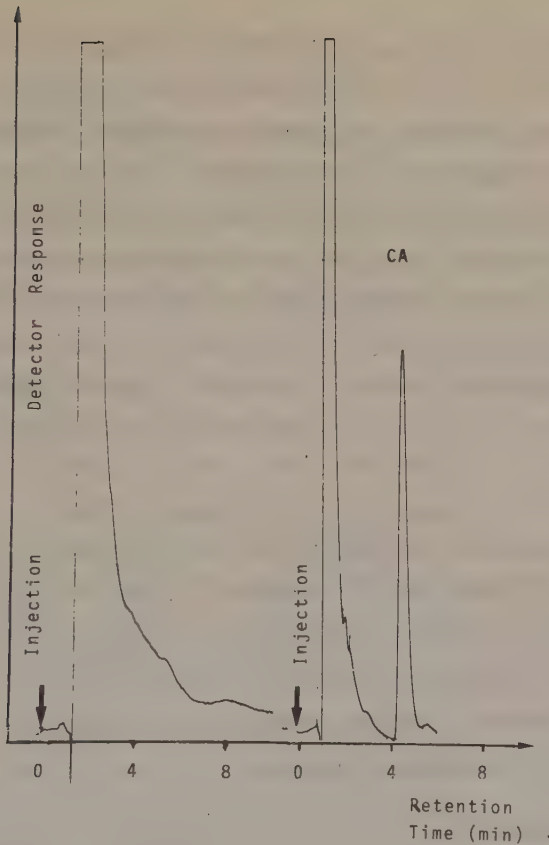


Abbildung 6 und Abbildung 7:

Chromatogramme einer Liquorprobe vor (links) und 45 Min. nach einer intravenösen Injektion von Chloramphenicol (CA).

Hochdruckflüssigkeitschromatograph: Spectra Physics Modell 740. Detektor: Spectra Physics SP 8200. Wellenlänge: 254 nm. Säulenfüllmaterial: Nucleosil C₁₈ (Macherey - Nagel & Co). Teilchengröße: 5 µm. Säulenlänge: 150 mm. Innerer Durchmesser: 4,6 mm. Mobile Phase: a., Für Serum: Methanol/Wasser (45/55); b., Für CSF: Methanol/Wasser (40/60). Fluß: 1 ml/min. Druck: 210 bar. Temperaturen: 25 °C. Funktion: isokratisch.

Filtrationen lassen sich mit den verschiedenen Filtern aus Papier, Kunststoff, Glas oder Keramik ausführen. Mit diesen Methoden sind jedoch nur gröbere Partikel aus dem Probenmaterial zu entfernen. Einige neu entwickelte Verfahren der Ultrafiltration erlauben es auch, Trennungen im molekularen Bereich vorzunehmen. Es gibt Membrane, die Moleküle bis zu 10 000 und 30 000 Dalton abscheiden. Ein Einmal-System zur Enteiweißung von Plasmaproben (System Ultrasep der Firma Millipore GmbH) ohne Einsatz von Vakuum und Druck erzielt Trenngrenzen von circa 40 000 Dalton. Die so behandelten Plasmaproben ergeben jedoch bei Zugabe von Perchlorsäure noch geringe Eiweißfällungen. Vollständigkeitshalber muß die Dialyse als Hilfsmittel für die Trennung von großen und kleinen Molekülen sowie für die Entsalzung und Konzentrierung erwähnt werden. In der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Praxis hat sie eine relativ geringe Bedeutung.

Zentrifugationen dienen zur Entfernung von Partikeln aus Lösungen und für die Phasentrennung nach Extraktionen. Für die in der HPLC neuerdings an Bedeutung gewinnende Gelpermeationschromatographie zur Trennung von Makromolekülen kann als Vorreinigungsstufe eine fraktionierte Ultrazentrifugation benutzt werden.

Relativ selten wird die Destillation als Probenvorbe-

reinigung eingesetzt. Bei der Analyse von Phenol im Urin hat sich die Wasserdampfdestillation als einfaches und selektives Probenaufbereitungsverfahren erwiesen. In Abbildung 8 ist das Chromatogramm einer über Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit Essigsäureethylester aufgearbeiteten Urinprobe zu sehen. Der Phenolpeak wird fast vollständig von Matricespeaks überdeckt. Bereitet man dagegen die Urinprobe über eine Wasserdampfdestillation auf (Abbildung 9), so lassen sich basisliniengetrennte Phenolpeaks erhalten (GOSSLER et al. 1979, vgl auch Kap. 2.2., S. 57).

Prinzipiell sind zur Probenvorbereitung alle chromatographischen Techniken aus der Flüssigkeits-, der Dünnschicht- und auch der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie für eine nachfolgende HPLC-Analyse möglich.

Im HPLC-Gerät selbst kann am Säulenkopf eine Probenanreicherung über Durchpumpen der Analysenlösung erzielt werden. Die Analyse erfolgt dann durch eine Gradientenelution. In einigen Fällen wird die Analyse von Pharmaka im biologischen Material mittels Einsatz der Säulenumschalttechnik beschrieben (HULPKE et al. 1981, RIGGENMANN 1981).

Auf den gleichen Adsorptionsprinzipien beruht die Vorreinigung von Probenmaterial mit den sogenannten SEP-PAK-Kartuschen (Waters Ass.). SEP-PAK-Kartuschen sind

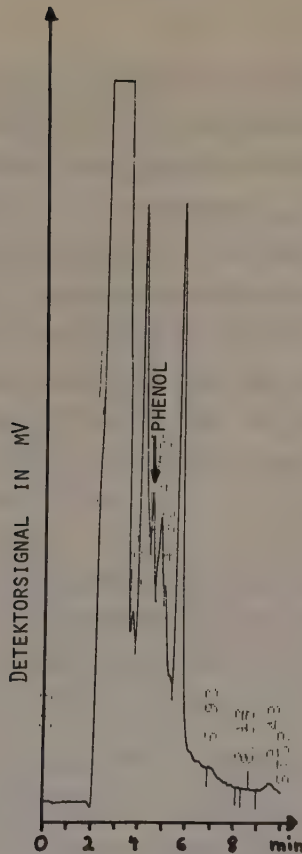


Abbildung 8:

Chromatogramm des aufgearbeiteten Urinextraktes einer Normalperson zur quantitativen Bestimmung von Phenol. Hochdruckflüssigkeitschromatographische Arbeitsbedingungen: Flüssigkeits-Chromatograph: Micromeritics Modell 7000. Detektor: Schoeffel-Spektralphotometer SF 770. Wellenlänge: 268 nm. Säulenfüllmaterial: Nucleosil C₁₈ (Macherey-Nagel & Co). Trennprinzip: Reversed Phase Chromatographie. Teilchengröße 10 µm. Innerer Durchmesser: 4,6 mm. Druck: Ca. 1000 psi. Probenmenge: 5 µl. Mobile Phase: Methanol/Wasser 1/1 (v/v). Funktion: isokratisch. Säulenlänge: 250 mm. Säulentemperatur: Raumtemperatur. Durchfluß: 1 ml/min. Probenlösungsmittel: (Nach Schoofs et al. 1978) mob. Phase.

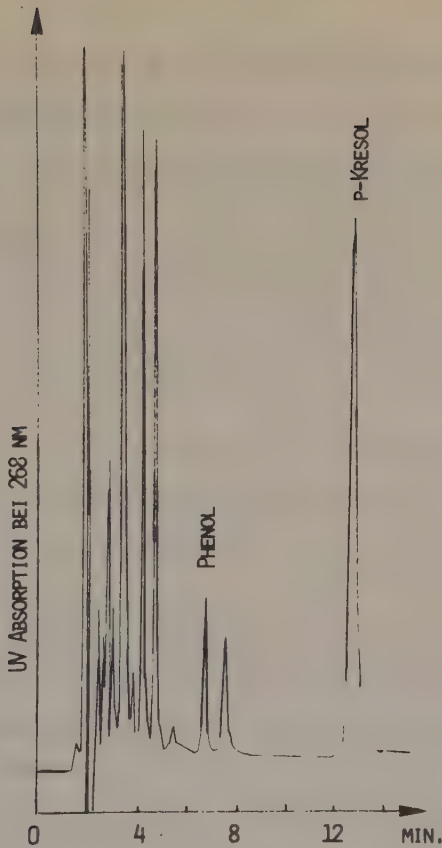


Abbildung 9: Chromatogramm einer Phenolanalyse aus Urin nach Probenvorbereitung über Wasserdampfdestillation. Hochdruckflüssigkeitschromatographische Arbeitsbedingungen: Flüssigkeits-Chromatograph: Micromeritics Modell 7000 (Coulter Scientific Krefeld). Detektor: Schoeffel-Spektralphotometer SF 770. Wellenlänge: 268 nm. Säulenfüllmaterial: Nucleosil C₁₈ (Macherey-Nagel + Co.). Trennprinzip: Reversed Phase Chromatographie. Teilchengröße: 5 µm. Säulenlänge: 250 mm. Innerer Durchmesser: 4,6 mm. Säulentemperatur: Raumtemperatur. Druck: ca. 5000 psi. Durchfluß: 1 ml/min. Probemenge: 100 µl. Probenlösungsmittel: mob. Phase. Mobile Phase: Methanol/Wasser 35/65 (v/v). Funktion: isokratisch.

kleine Säulen mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Länge von 0,5 bis 2 cm, die wahlweise mit Reversed Phase-Material für die Adsorption unpolarer Substanzen oder mit Silikagel-Material für polare Substanzen gepackt sind. Das Probenmaterial wird durch die Säulen gedrückt und adsorbiert. Die Elution erfolgt dann mit einem geeigneten Lösemittel. Ähnliche Vorreinigungen lassen sich mit den Extrelut-Säulen (Merck) vornehmen. Dies sei am Beispiel der Analyse von 4,4'-Methylen-bis-(2-Chloranilin)(MOCA^R) im Urin erläutert (WILL et al. 1981, vgl. Kap. 2.6., S.135). Eine Zusammenstellung von Applikationsbeispielen mit Extrelut-Säulen wird bei BREITER (1981) gegeben.

Chemische Reaktionen als Bestandteil der Probenvorbereitung werden in der HPLC weniger häufig als in der Gas-Chromatographie vorgenommen. Allgemein muß zwischen Reaktionen vor oder nach der chromatographischen Trennung unterschieden werden ("pre- und post column"-Reaktionen).

Die Durchführung chemischer Reaktionen vor der eigentlichen chromatographischen Trennung erfolgt zumeist aus zwei Gründen:

- a) Viele Substanzen lassen sich mit den herkömmlichen Detektionssystemen nicht oder nicht in genügend geringen Mengen nachweisen. Mit chemischen Reaktionen

kann man entweder Chromophore in das Molekül einführen oder dieses selbst in ein Chromophore verwandeln.

- b) Die Polarität des Analyten erlaubt keine oder nur eine schlechte Trennung. Durch eine Derivatisierung wird sein chromatographisches Verhalten positiv beeinflusst (vgl. beispielsweise das Verfahren zur Bestimmung von Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure, WILL et al. 1980, Kap. 2.4., S.104).

Analytische Prüfung der Probenvorbereitung

Die Qualität einer Methode wird durch ihre analytischen Zuverlässigkeitskriterien charakterisiert. Bei der Probenvorbereitung müssen hohe Wiederauffindungsraten und eine gute Präzision erzielt werden. Ebenso verlangt man vom Probenvorbereitungsverfahren, daß es einen Beitrag zur Verbesserung der Spezifität liefert.

Die Wiederauffindungsraten können auf drei verschiedenen Wegen bestimmt werden:

1. Quantifizierung des absoluten Wertes durch Peakflächenvergleich aufgearbeiteter Proben mit Eichlösungen direkt injizierter Substanzen. Dieses Verfahren läßt sich in Fällen, in denen Derivatisierungsreaktionen ausgeführt wurden, nicht immer vornehmen.

2. Vergleich der Peakhöhen von Standard-Additions-Eichkurven mit denen wässriger Eichreihen. Diese wässrigen Proben müssen ebenfalls der Probenvorbereitung unterzogen werden.
3. Probenmaterial unterschiedlicher Matrix wird mit definierten Mengen des Analyten versetzt und die Peakhöhen gegen eine Additions-Eichkurve verglichen. Hiermit können Matrix-bedingte Unterschiede, z.B. bei verschiedenen Urinproben, ermittelt werden. In diesen Fällen kann die Wiederauffindungsrate den Wert 100 % übersteigen.

Die addierten Mengen bei der Bestimmung der Wiederauffindungsraten sollten in einem realistischen Konzentrationsbereich liegen. In Fällen, bei denen ein interner Standard für die Quantifizierung benutzt wird, ist die Wiederauffindungsrate auch für diese Verbindung zu ermitteln. Erhält man für die Wiederauffindungsrate Werte, welche um und unter 60 % liegen, so ist der Arbeitsschritt aufzufinden, bei dem die Verluste eingetreten sind. Das eleganteste Verfahren ist, der Probe vor der Aufarbeitung radioaktive Substanz beizumischen und hiermit jeden einzelnen Arbeitsschritt zu überprüfen.

Für eine exakte quantitative Auswertung ist die Zugabe eines internen Standards vor der Probenaufarbeitung immer die Methode der Wahl. Verluste während der Aufarbei-

tung, unterschiedliches Verhalten des Probenmaterials (Matrixeffekte) usw. können so ausgeglichen werden.

Folgende drei Forderungen werden an einen internen Standard gestellt:

1. Er muß chemisch dem Analyten ähnlich sein.
2. Er sollte einen vergleichbaren Detektorrespons wie der Analyt ergeben.
3. Die Retentionszeiten müssen im selben Bereich wie die des Analyten sein.

Bei Analysenmethoden, für die man Wiederauffindungsraten von circa 100 % ermittelt hat, wird oft auch eine externe Standardisierung benutzt. Im Falle matrixbedingter unterschiedlicher Wiederauffindungsraten muß eine Zumischung des externen Standards für jede einzelne Probe erfolgen. Die Methode des externen Standards erleichtert vor allem die chromatographische Trennung. Dies resultiert daraus, daß insbesondere bei der Chromatographie komplexer Matrices im Chromatogramm oft keine freie Stelle mehr für einen internen Standard vorhanden ist. Abschließend soll darauf hingewiesen werden, daß sowohl bei der Methodenentwicklung als auch beim Einsatz des Verfahrens eine Leerwertprobe gemessen werden muß. Dieses Material sollte den Analyten nicht enthalten und muß der normalen Probenaufarbeitung unterzogen wer-

den. Im Chromatogramm darf bei der interessierenden Retentionszeit kein Peak vorhanden sein. Dies ist jedoch nicht immer möglich. Es müssen dann zur Ermittlung der Spezifität andere Verfahren aus der Chromatographie und der Spektroskopie verwendet werden.

Die vorliegende Darstellung hat gezeigt, welche Bedeutung der Entwicklung geeigneter Probenvorbereitungsmethoden in der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie zukommt.

2. Methodensammlung für quantitative HPLC-Bestimmungen im Urin

2.1. Bestimmung von Kreatinin im Urin

2.1.1. Einleitung

Bei der Bestimmung der Urinkonzentrationen harngängiger Arbeitsstoffe bzw. deren Metaboliten im Rahmen arbeitsmedizinisch-toxikologischer Vorsorgeuntersuchungen kann man sich nicht auf 24-Stunden-Urinsammlungen als Bezugsgröße stützen. In der Regel erhält man eine zu einem beliebigen Zeitraum, meist am Ende der Arbeitsschicht oder der Arbeitswoche, gewonnene Spontanurinprobe. Um Diurese-bedingte Schwankungen zu minimieren, ist man auf andere, für die glomeruläre Filtrationsrate indikative Parameter angewiesen. In der arbeitsmedizinischen Praxis wird häufig das Kreatinin als Bezugsgröße zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen aus Harnproben verwandt. Man bildet dabei den Quotienten aus der Urinkonzentration des Schadstoffes und des Kreatininspiegels. Kreatinin fällt als Nebenprodukt des Muskelstoffwechsels an. Es ist das Anhydrid des Kreatins, welches als Kreatinphosphat in der sogenannten Kreatininkinase-reaktion eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung energiereicher Phosphate für den Arbeitsstoffwechsel des Muskels spielt.

Maßgebend für die Wahl des Kreatinins als Standardisierungsgröße war die von zahlreichen Autoren beschriebene Konstanz in der renalen Ausscheidung dieses Metaboliten (SZADKOWSKI et al. 1970 und 1971). Die Kreatininausscheidung über die Nieren ist abhängig von der Muskelmasse des Körpers und daher von Alter und Geschlecht. Für Männer beträgt sie circa 1,8 g/Tag, für Frauen circa 1,2 g/Tag.

Zur quantitativen Bestimmung des Kreatinins im Urin und auch im Serum wird fast ausschließlich die Jaffé-Reaktion benutzt. Hierbei reagiert das Kreatinin mit alkalischer Pikrat-Lösung und bildet einen orangeroten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 490 nm (JAFÉ 1886).

Das Verfahren ist methodisch einfach, aber wenig spezifisch. An die Stelle des Kreatinins können auch andere Substanzen mit aktiven Methylengruppen treten und ähnliche Farbkomplexe bilden. Dieser Effekt bedingt die Unspezifität der Jaffé-Reaktion.

In der Vergangenheit sind zahlreiche Versuche unternommen worden, die Spezifität der Jaffé-Reaktion zur Bestimmung des Kreatinins im Serum zu erhöhen. Durch die Adsorption des Kreatinins an Fullererde gelang erstmals eine von allen bekannten Störfaktoren unabhängige Bestimmung des "wahren Kreatinins" im Mikrolitermaßstab.

Dieses Verfahren ist jedoch relativ aufwendig.

Zur Bestimmung des "wahren Kreatinins" sind in der Zwischenzeit auch einige hochdruckflüssigkeitschromatographische Verfahren entwickelt worden (SOLDIN und HILL 1978, HENKEL et al. 1980, HAUSEN et al. 1981).

Ein vereinfachtes und spezifisches Verfahren wird im folgenden vorgestellt.

2.1.2. Methodik

2.1.2.1. Prinzip des Verfahrens

Die Kreatininkonzentration im Harn wird nach Direktinjektion der verdünnten nativen Harnprobe hochdruckflüssigkeitschromatographisch ermittelt. Die HPLC-Analyse erfolgt mit der Reversed-Phase-Technik und UV-Detektion bei 218 nm.

2.1.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP) Modell 1084 B

Detektor: Variabler Wellenlängendetektor-Hewlett Packard (HP)

Chemikalien:

Kreatinin (Merck)

Aqua bidest

Lösungen:

Stammlösung:

8 mg Kreatinin und 2 ml Poolurin werden mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung entspricht einer Kreatininkonzentration von 4 g/l.

Eichlösungen:

Die Stammlösung wird mit verdünntem Poolurin, welcher 1 : 5 mit Wasser versetzt wurde, auf Kreatininkonzentrationen von 1, 2 und 3 g/l gebracht. Die für den Ansatz verwendete verdünnte Poolurinprobe muß als Leerwert analysiert werden.

2.1.2.3. Probennahme und Probenlagerung

Die Urinproben können mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Für längere Zeiträume empfiehlt sich die Konservierung im Kühlschrank bzw. in der Tiefkühltruhe. Eichlösungen und deren Verdünnungen können ebenfalls durch Tiefkühlen bei sachgerechtem Auftauen mehrmals verwendet werden.

2.1.2.4. Arbeitsvorschrift

Filtration

1

Ca. 5 ml Urin werden durch ein feinporiges Filter gegeben

Verdünnung

2

1 ml Filtrat; mit dest. Wasser auf 5 ml auffüllen

HPLC

3

Wellenlänge: 218 nm
Säulenfüllmaterial: Li-Chrosorb RP 18 (HP-Fertigsäule)
Trennprinzip: Reversed Phase
Teilchengröße: 10 μ m
Säulenlänge: 250 mm
Innerer Säulendurchmesser: 4,6 mm
Säulentemperatur: 40⁰ C
Druck: 68 bar
Fluß: 3 ml/min
Probenvolumen: 5 μ l
Mobile Phase: Wasser
Funktion: isokratisch

Quantitative Auswertung

4

2.1.2.5. Eichung

Die Eichkurve ist im Bereich von 0 bis 4 g Kreatinin pro Liter Harn linear (Abb. 10).

In diesem Bereich finden sich die normalerweise im Urin vorliegenden Kreatininkonzentrationen.

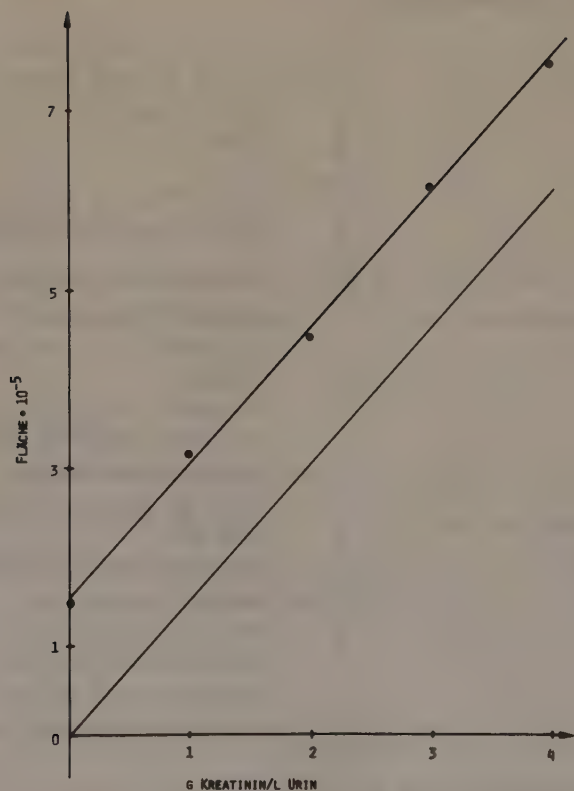


Abbildung 10: Additions-Eichkurve für Kreatinin im Urin
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph:
Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

2.1.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Die achtfache Analyse einer Urinprobe mit einem Kreatiningehalt von 1,9 g/l ergab einen Variationskoeffizienten in der Serie von 3,1 %.

Die Bestimmung der Wiederauffindungsrate ist nicht sinnvoll, da es sich bei dem beschriebenen Verfahren um eine Direktinjektionsmethode handelt.

Die Nachweisgrenze liegt bei 0,05 g Kreatinin/l Urin.

2.1.3. Diskussion

Das vorliegende Verfahren zur Bestimmung des "wahren Kreatiningehaltes" zeichnet sich vor allem durch seine Einfachheit und Spezifität aus.

In Abbildung 11 ist das Chromatogramm eines wässrigen Kreatininstandards und einer Urinprobe mit einer Kreatininkonzentration im Normalbereich dargestellt. Die Bestimmung des Kreatinins mit der HPLC ist dann besonders sinnvoll, wenn zusätzlich noch einige andere Parameter unter identischen chromatographischen Bedingungen ermittelt werden können. So können z.B. die Hippursäure und die Methyl-Hippursäure gemeinsam mit dem Kreatinin in einem einzigen Analysengang quantifiziert werden. Ein Chromatogramm einer Urinprobe einer Toluol- und

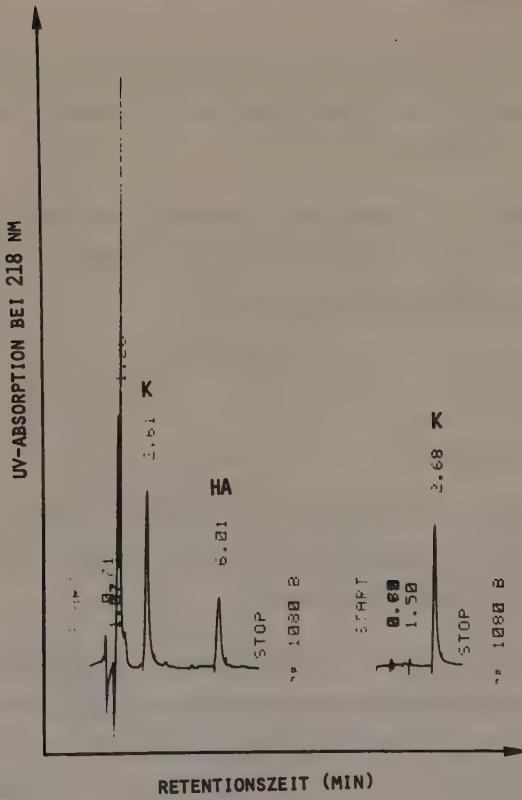


Abbildung 11: Chromatogramm eines wässrigen Kreatinin-Standards (rechts) und einer Urinprobe (links).
HA = Hippursäure
K = Kreatinin

Xylol-exponierten Person ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Diese kombinierte Bestimmung der Hippursäure und der Methyl-Hippursäure und des Kreatinins ist für Screeningzwecke geeignet. Im Gegensatz zu dem in Kapitel 2.3., Seite 80 angegebenen Verfahren besitzen die Metaboliten der Lösemittel in der Peakform jedoch ein wesentlich größeres Tailing und daher schlechtere Nachweisgrenzen.

Paralleluntersuchungen mit der herkömmlichen photometrischen Jaffé-Reaktion und mit einem Kreatinin-Auto-Analyser ergaben die in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellten Korrelationsdiagramme. Mit der HPLC und der Jaffé-Reaktion wurden 69 Urinproben parallel vermessen. Der Korrelationskoeffizient von 0,89 zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden. Man kann jedoch erkennen, daß die Jaffé-Reaktion grundsätzlich etwas höhere und hiermit unspezifischere Werte ergibt.

Bei Parallelanalysen von 16 Urinproben mit der HPLC und dem Kreatinin-Analyser 2 (Beckman-Instruments GmbH) erzielten wir einen Korrelationskoeffizienten von 0,91. Auch hier sind die Meßwerte des ebenfalls nach dem Jaffé-Prinzip arbeitenden Auto-Analysers geringfügig höher als bei der HPLC.

Neben den vorgenommenen Parallelanalysen konnte die Aufnahme von UV-Spektren als weiteres Kriterium für

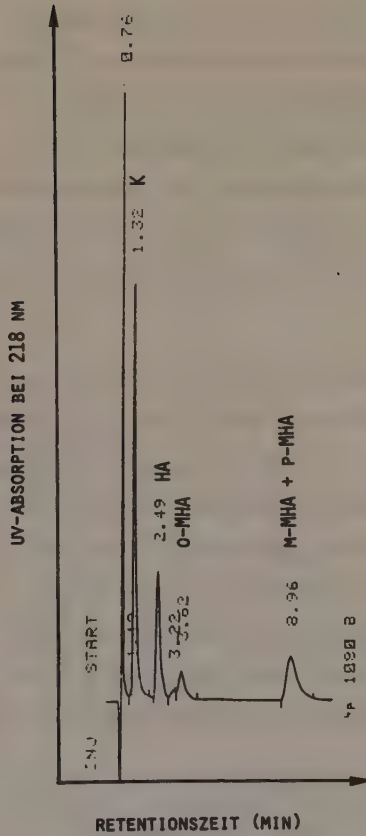


Abbildung 12: Chromatogramm der Urinprobe einer Toluol- und Xylol-exponierten Person. Kreatinin (K), Hippursäure (HA), o-Methylhippursäure (o-MHA), m-Methylhippursäure (m-MHA), p-Methylhippursäure (p-MHA)

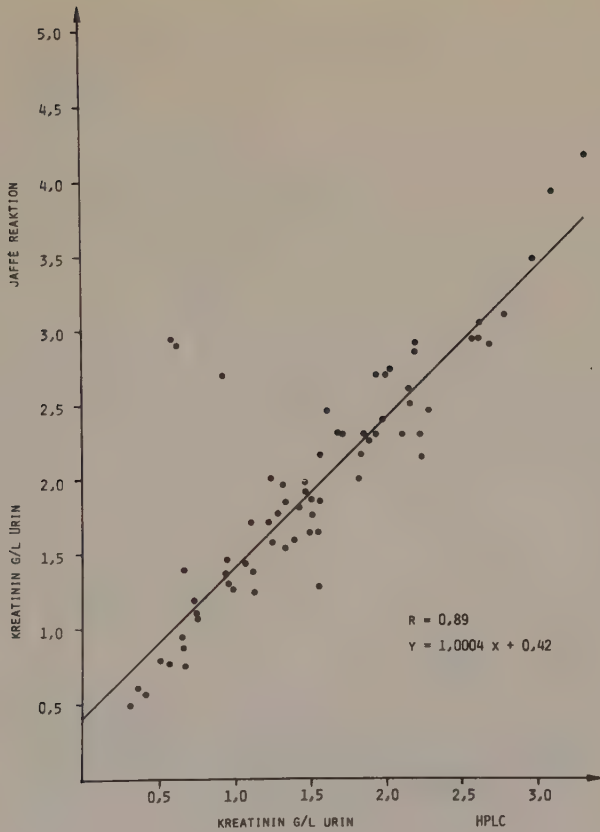


Abbildung 13: Korrelationsdiagramm einer Kreatinin-Paralleluntersuchung mit der Methode nach JAFFE und der HPLC

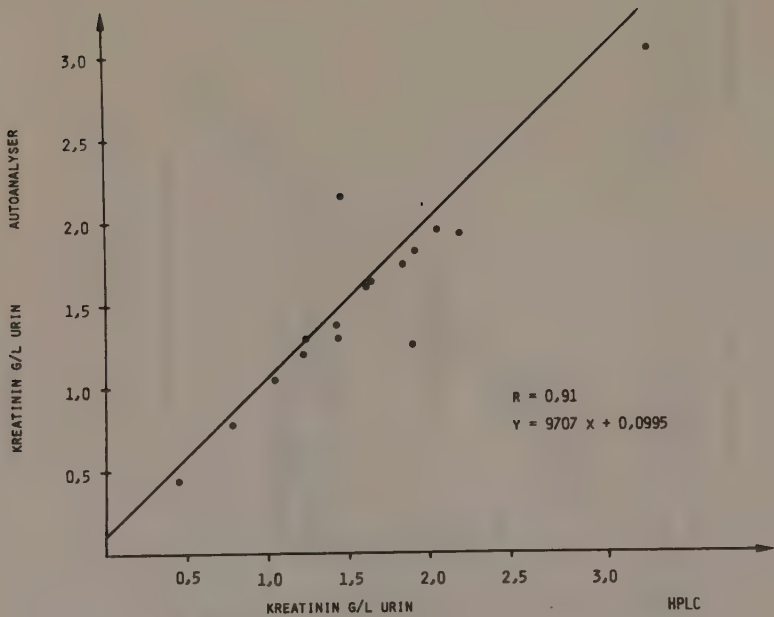


Abbildung 14: Korrelationsdiagramm einer Kreatinin-Paralleluntersuchung mit einem Kreatinin-Auto-Analyse und der HPLC.

die Spezifität unseres Verfahrens herangezogen werden. In Abbildung 15 ist der Scan eines Kreatinin-Peaks einer Urinprobe abgebildet. Das Spektrum stimmt mit dem eines Kreatininstandards überein. Mit dem Kreatininanalysator beträgt der Zeitaufwand circa 4 Minuten pro Urinprobe, bei Verwendung des HPLC HP 1084 b mit automatischem Probengeber nur circa 3 bis 3 1/2 Minuten.

Somit werden die heutigen Erfordernisse an eine Labor-methode hinsichtlich der Praktikabilität und der analytischen Zuverlässigkeit von dem vorgestellten HPLC-Verfahren erfüllt.

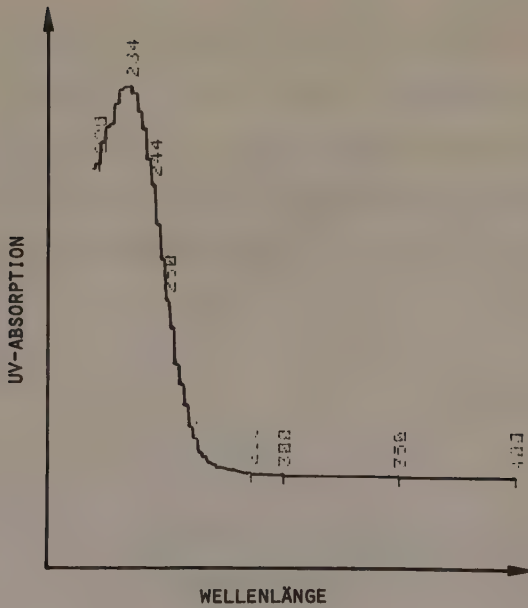


Abbildung 15: Scan eines Kreatininpeak einer Urinprobe.
Das Absorptionsmaximum liegt bei 233 nm

2.2. Bestimmung von Phenol im Urin

2.2.1. Einleitung

Benzol ist in manchen Rohölen und in dem daraus hergestellten Benzin und Petroleum enthalten. Es ist daher in Brenn- und Treibstoffgemischen enthalten sowie in Reinigungs- und Lösungsmitteln, in Farben und Farbentfernern. Benzol wird bei der Verarbeitung von Kunststoffen, als Lösungsmittel von Gummi und als Ausgangsmaterial für chemische Synthesen benötigt (VALENTIN et al. 1979).

Benzol sollte wegen seiner kanzerogenen Eigenschaften als Arbeitsstoff weitgehend durch Toluol bzw. dessen höhere Homologe ersetzt werden. Trotzdem kann in bestimmten Bereichen der Industrie auf diesen aromatischen Kohlenwasserstoff nicht ganz verzichtet werden, etwa, wenn er als Ausgangspunkt für Synthesen verwendet wird. Die Verunreinigung industriell verwendeter Lösemittel mit Benzol muß als Expositionsquelle berücksichtigt werden.

Die Toxizität des Benzols ist bereits seit circa 100 Jahren bekannt. Als Ursache der myelotoxischen Wirkung des Benzols wird heute das sehr reaktionsfreudige Benzolepoxid angesehen, das als instabiles Zwischenprodukt bei der Oxidation des aromatischen Systems zu Phenol

entsteht.

Die Aufnahme von Benzol in den menschlichen Körper erfolgt hauptsächlich über die Lunge. Dieser Weg spielt bei der akuten und bei der chronischen Vergiftung im Berufsleben die entscheidende Rolle. Die Möglichkeit einer oralen oder perkutanen Aufnahme ist zwar gegeben, aber nur von ganz untergeordneter Bedeutung. Durch in vivo-Versuche wurde deutlich, daß circa 43 % des aufgenommenen Benzols unverändert wieder abgeatmet werden. Der Rest gelangt über die Lungenalveolen in die Blutbahn und wird in der Leber zu Phenol metabolisiert. Dies trifft für 23 % des eingeatmeten Benzols zu. Geringe Prozentsätze werden als Hydrochinon (4,8 %), als Catechol (2,2 %) oder als Hydroxihydrochinon (0,3 %) ausgeschieden. Die Metabolisierung des Benzols ist in Abbildung 16 ausführlich dargestellt (VALENTIN 1979).

Bei durch Benzol verursachten Erkrankungen müssen zwei Verlaufsformen unterschieden werden:

- a) akute Vergiftungen, wobei die narkotischen Wirkungen im Vordergrund stehen

Wirkungen über das ZNS:

Im ersten Stadium einer Benzolvergiftung kann es zu Kopfschmerzen, Müdigkeit, Übelkeit, Schwindelgefühl, Muskeltremor und Bewußtseinstörungen (entsprechend

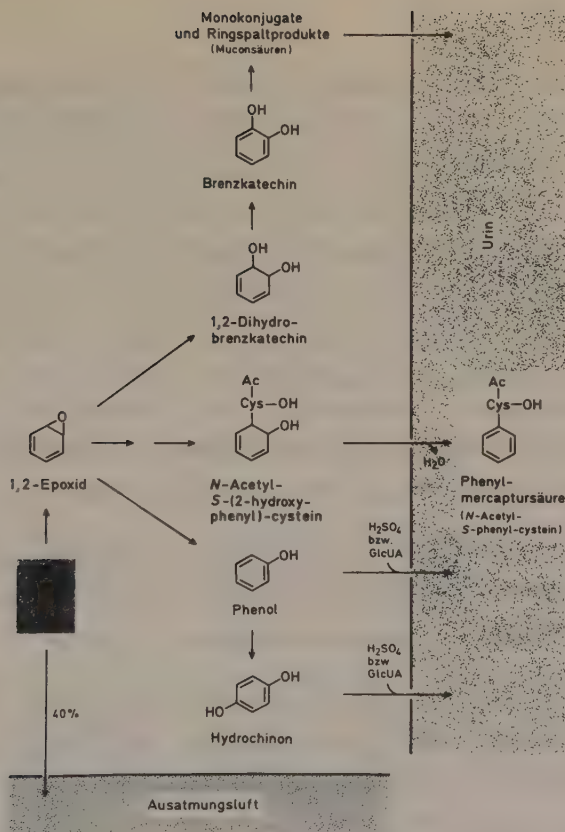


Abbildung 16: Metabolisierungsschema von Benzol (nach VALENTIN 1979)

einem Pränarkosestadium) kommen. Im darauffolgenden Exzitationsstadium tritt eine Verstärkung der Symptome sowie Erregtheit ein. Es kann zu Konvulsionen bis zu tonisch-klonischen Krämpfen kommen. Bei noch größeren und längeren Benzoleinwirkungen kann die narkotische Wirkung Bewußtseinsverlust hervorrufen und unter Umständen den Tod. Beim Überleben werden Defektheilungen beschrieben.

Einwirkungen über die Augen können zu Irritation der Konjunktiva und passageren Blindheit führen.

Der Respirationstrakt wird durch Irritationen der Schleimhäute und zentral-nervös bedingte Regulationsstörungen der Atmung geschädigt.

Benzol kann auch auf das Herz-Kreislauf-System einwirken. Es kommt zu Vasodilatation, Regulationsstörungen des Kreislaufes, petechialen Blutungen im Gehirn sowie in der Serosa und Mucosa des Gastrointestinaltraktes und Urogenitaltraktes.

b) Chronische Vergiftungen

Als Allgemeinsymptome werden Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Schwindelgefühl, Kopfschmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Nervosität, Schlafstörungen, Schweißausbrüche und Tachykardien beschrieben. Charakteristisch ist eine Überempfindlichkeit gegen Alkohol.

Schleichend und häufig unerkannt kommt es zu Veränderungen des hämatopoetischen Systems mit einer Schädigung der Blutbildungsstätten; auch quantitative Veränderungen im Verhältnis der weißen zu den roten Blutkörperchen werden beschrieben. Jedoch ist keine spezifische Regelhaftigkeit zu erkennen. Gelegentlich kann es zu Leukozytosen, wie auch zu Leukämien aller Arten und Verlaufsformen kommen. Außerdem sind extramedulläre Erythropoesen in Leber und Milz und erhöhte Hämolyse in der Milz möglich. Die Hämoglobinsynthese und die Antikörperbildung sind verringert. Die genannten Schäden können auch längere Zeit nach Expositionsende auftreten.

Die Permeabilität der Gefäße kann durch chronische Benzoleinwirkung gesteigert und die Blutungsneigung erhöht werden. Dies führt zu petechialen Blutungen in Cutis und Schleimhäuten vor allem der Nase und Gingiva.

Als sonstige Symptome werden Hypazidität des Magensaftes und Störungen der exokrinen Funktionen des Pankreas wie auch Gelenkschmerzen aufgeführt.

Der Unfallverhütungsbericht der Bundesregierung, Deutscher Bundestag 9. Wahlperiode, Drucksache 9/2045 (UVB - 1982) weist bezüglich der genannten Berufskrankheiten für die Jahre 1980/1981 folgende Zahlen aus

	angezeigt	entschädigt
1980	94	10
1981	85	5

Im Rahmen von Überwachungsuntersuchungen bei einer Einwirkung von Benzol wird als Expositionstest die Phenolkonzentration im Urin bestimmt. Ab einer Konzentration von 20 mg Phenol/l Urin ist eine Benzol-Einwirkung gegeben. Der arbeitsmedizinisch tolerierbare Grenzwert liegt in der Bundesrepublik Deutschland zur Zeit bei 50 mg Phenol/l Urin. Phenol wird auch im Harn von nicht beruflich Benzol-belasteten Personen ausgeschieden. Die obere Normgrenze liegt bei 15 mg Phenol/l Urin.

Zur quantitativen Bestimmung von Phenol im Urin wurden bisher photometrische (BARDODEJI 1968, SZADKOWSKI et al. 1973, ANGERER 1978), gaschromatographische (VAN HAFTEN und SIE 1965, SHERWOOD und CARTER 1970, BUCHET et al. 1972, DIRMKIS und DARBRE 1974, KONG und LARSEN 1977, ANGERER 1979) und hochdruckflüssigkeitschromatographische (SCHOOFS et al. 1978, ANGERER 1979, GOSSLER und SCHALLER 1979) Bestimmungsverfahren beschrieben.

Die von uns entwickelte hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode zeichnet sich vor allem durch eine einfache Probenvorbereitung, spezifische Detektion und kurze Analysenzeiten aus.

2.2.2. Methodik

2.2.2.1. Prinzip des Verfahrens

Viele Phenole sind wasserdampf­flüchtig. In stark schwefelsaurer Lösung werden die im Urin vorliegenden Glucuronsäureester und Sulfatester der Phenole zunächst hydrolysiert und dann sogleich mit dem Wasserdampf abdestilliert (ANGERER 1978). Eine definierte Menge des Destillates wird aufgefangen und ein Aliquotes davon direkt in den HPLC injiziert. Als mobile Phase dient ein Methanol-Wasser-Gemisch. Zur chromatographischen Trennung wird die Reversed Phase-Chromatographie auf C₁₈-Säulenfüllmaterialien eingesetzt. Die Detektion erfolgt mit einem Spektralphotometer mit Durchflußzelle im Absorptionsmaximum des Phenols. Alternativ dazu kann man auch die spektralfluorimetrische Detektion verwenden, wobei Anregungs- und Emissionswellenlänge auf das Fluoreszenzmaximum des Phenols eingestellt werden.

2.2.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

Detektoren: Variabler Wellenlängendetektor (UV-VIS)
Hewlett Packard (HP)

Spektralfluorimeter FS 970

(Kratos-Schoeffel Instruments)

Spektralfluorimeter IY3 (ISA-Iobin Yvon)

Wasserdampfdestillationsapparatur

Chemikalien:

Phenol p.A. (Merck) - vor der Einwaage frisch sublimiert und für spätere Verwendungszwecke unter Stickstoff aufbewahrt.

Schwefelsäure p.A. (Merck)

Eichlösungen:

Als Stammlösung werden 5 mg Phenol in 100 ml Pool-Urin entsprechend 50 mg Phenol/l Urin aufgelöst. Aus dieser Stammlösung werden mit Pool-Urin Verdünnungen mit 1; 5; 10 und 20 mg/l Urin hergestellt. Zur Bestimmung des Analysenleerwertes muß der Pool-Urin mit untersucht werden.

2.2.2.3. Probennahme und Probenlagerung

Die Urinproben werden ohne irgendwelche Zusätze bis zur Analyse im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Ebenso können die Destillate gelagert werden. Eichproben lassen sich sowohl als Originallösungen als auch als Destillate durch Einfrieren und sachgemäßes Auftauen mehrmals wiederverwenden.

2.2.2.4. Arbeitsvorschrift

Probenvorbereitung

1

10 ml Urin (bzw. Standards)
+ 15 ml Wasser
+ 2,5 ml konz. H_2SO_4

Wasserdampf-
destillation

2

100 °C
Es werden die ersten 25 ml
Destillat aufgefangen.
Längere Lagerung bei +4 °C
möglich.

HPLC

3

Wellenlänge: 270 nm
Trennsäule: HP-Fertigsäule
Säulenfüllmaterial: Li-Chro-
sorb^R
RP-18
Trennprinzip: Reversed Phase
Teilchengröße: 5 µm
Säulenlänge: 25 cm
Inn. Säulendurchmesser: 4,6 mm
Säulentemperatur: 50 °C
Durchfluß: 1 ml/min
Druck: 140 bar
Probenmenge: 50 µl
Probenlösemittel: Wasser
Mobile Phase: Methanol/Wasser
(65/35; v/v)
Funktion: isokratisch

Quantitative Auswertung

4

2.2.2.5. Eichung

Zur Erstellung von Additionseichkurven wird Pool-Urin mit 0; 1; 10; 20 und 50 mg Phenol/l Urin versetzt. Diese Standards werden analog den Urinproben aufgearbeitet. Die erhaltenen Eichkurven sind im angegebenen Bereich linear. Durch Parallelverschiebung dieser Eichkurve durch den Nullpunkt wird eine graphische Subtraktion der Phenolkonzentration des Pool-Urins vorgenommen. Diese parallel verschobene Gerade wird für die Auswertung unbekannter Proben herangezogen.

Zur Qualitätskontrolle wird bei jeder Analysenserie ein Aliquotes einer Urinprobe mitgeführt, deren Phenolgehalt bekannt ist. In Portionen aufgeteilt sind derartige Kontrollurinproben in der Tiefkühltruhe lagerbar (ANGERER und SCHALLER 1976).

2.2.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Die achtfache Analyse einer Urinprobe ergab bei einem mittleren Phenolgehalt von 3,8 mg/l Urin eine Präzision in der Serie von 5,6 %.

Die Prüfung der Richtigkeit erfolgte durch Wiederauffindungsversuche. Da die Probenaufarbeitung lediglich in einer Wasserdampfdestillation besteht, haben wir die

Verluste bei diesem Arbeitsschritt überprüft. Der Vergleich der Ergebnisse der Messung einer wässrigen phenolischen Lösung mit und ohne Destillation ergab reproduzierbar eine Wiederauffindung des Phenols von 84,1 %. Durch die Verwendung von Additions-Eichkurven wird dieser Verlust berücksichtigt.

Als Nachweisgrenze ergibt sich unter den beschriebenen Bedingungen eine Konzentration von 0,5 mg Phenol/l Urin. Dies reicht aus, um auch bei Normalpersonen die Phenolausscheidung quantitativ erfassen zu können.

Die Praktikabilität der Methode liegt bei 40 Phenolbestimmungen pro Tag und Assistent. Durch den Einsatz mehrerer Wasserdampfdestillationsapparaturen und eines automatischen Probengebers für die HPLC können größere Durchsätze erzielt werden.

2.2.3. Diskussion

In Abbildung 17 ist ein Chromatogramm einer HPLC-Bestimmung von Phenol im Urin dargestellt. Es handelt sich um die Urinprobe eines mit Benzol belasteten Arbeiters. Der Phenol-Peak hat eine Retentionszeit von 4,04 Minuten. Das im Urin ebenfalls vorkommende Kresol erscheint nach 5,08 Minuten. Unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen erscheinen o-, m- und p-Kresol als ein Peak. Bei Erniedrigung des Methanolanteils in der mobi-

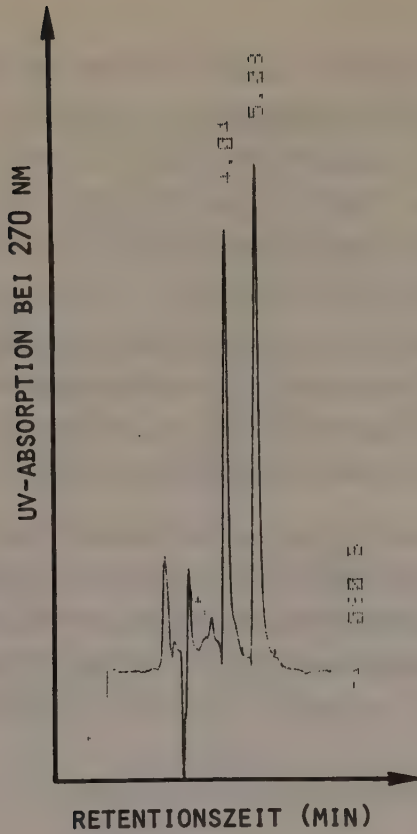


Abbildung 17: Chromatogramm einer HPLC-Bestimmung von Phenol
im Urin mit photometrischer Detektion

len Phase lassen sich o- und p-Kresol voneinander trennen. Das beschriebene Analysenverfahren kann somit auch für die quantitative Bestimmung der Kresole im Urin herangezogen werden.

Besonders wichtig für dieses Analysenverfahren ist die Art der Probenaufarbeitung. Versuche, das Phenol mit Essigsäureethylester aus dem Urin zu extrahieren, die organische Phase einzudampfen und dann nach Wiederaufnahme in mobiler Phase die HPLC-Analyse auszuführen, ergaben unbefriedigende Ergebnisse (Abb. 8, vgl. Kap. 1.2.2., S. 21).

Das Phenol konnte bei diesem Verfahren in den Peaks der biologischen Matrix lediglich als schlecht abgetrennter Aufsetzer erhalten werden. Wurde der Methanolanteil der mobilen Phase zur Verbesserung der Trennung verringert, so verbreiterte sich der Phenolpeak so stark, daß die Nachweisgrenzen zur Bestimmung der Substanz im Normbereich bei circa 5 mg/l Urin nicht mehr ausreichten. Das Verfahren der Wasserdampf-Destillation hingegen ergab saubere Chromatogramme mit guten Nachweisgrenzen und vernünftigen Analysenzeiten.

Wie die Tabelle 3 (nach ROBERTS und CASERIO 1965) erkennen läßt, stellt eine Wasserdampf-Destillation ein selektives Verfahren für die Probenvorbereitung aus biologischem Material dar. Die Tabelle zeigt, daß es

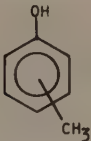
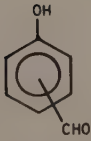
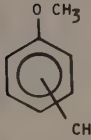
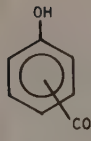
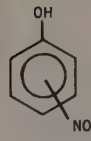
VERBINDUNG		WASSERDAMPF- FLÜCHTIGKEIT
	ORTHO META PARA	+ + + + + +
	ORTHO META PARA	+ - -
	ORTHO META PARA	+ + +
	ORTHO META PARA	+ - -
	ORTHO META PARA	+ - -

Tabelle 3: Wasserdampflichkeit einiger disubstituierter Benzolverbindungen in Abhängigkeit von der Substitution (nach ROBERTS und CASERIO 1965)

hiermit z.B. möglich ist, o-Salicylsäure von der m- und der p-Form zu trennen.

Unsere Studien haben ergeben, daß Reversed Phase-Säulenfüllmaterialien für die chromatographische Trennung die besten Ergebnisse bringen. Versuche, eine Anionenaustauschersäule einzusetzen, scheiterten. Das Phenol erscheint stets mit dem Tot-Volumen der Säule. Selbst mobile Phasen, welche auf pH-Werte von 8 - 9 eingestellt waren, um eine Dissoziation des Phenols zum Phenolat anion zu erreichen, zeigten dieses Verhalten. Erklären läßt sich das durch den hohen p_{ka} -Wert des Phenols mit 10,0. Für eine Ionenaustauscherchromatographie stehen bei pH-Werten von 8 - 9 zu wenige Phenolat anionen zur Verfügung. Andererseits erlaubt es jedoch die Stabilität der Säulenfüllmaterialien nicht, die mobile Phase alkalischer als pH 9 zu machen.

Die Reversed Phase-Chromatographie mit C_{18} -Säulenfüllmaterialien ergab gute Abtrennungen des Phenols von der biologischen Matrix. Methanol/Wasser-Gemische erlauben je nach Mischungsverhältnis höhere bzw. niedrigere Retentionszeiten für den Phenol-Peak. Als wichtig erwies sich jedoch die Benutzung von Säulenfüllmaterialien mit einer Teilchengröße von 5 μm . Schon bei 7,5 μm reicht die Auflösung des Systems nicht aus.

Zur Ermittlung der für die Detektion wichtigen opti-

malen Wellenlänge haben wir einen Scan eines Phenol-Peaks vorgenommen (Abb. 18). Neben einem UV-Maximum bei circa 214 nm ist ein weiteres bei 270 nm erkennbar. Diese Wellenlänge wurde von uns zur Detektion ausgewählt.

Phenole besitzen neben ihrer UV-Absorption auch noch eine ausgeprägte Fluoreszenz. Das Anregungsmaximum ist dabei das Absorptionsmaximum. Die Emissionswellenlänge liegt im Bereich von 300 nm, also relativ dicht bei der Anregungswellenlänge.

In Abbildung 19 und Abbildung 20 ist das Chromatogramm einer aufgearbeiteten Urinprobe einmal bei photometrischer und einmal bei fluorimetrischer Detektion dargestellt. Es handelt sich um die gleiche Urinprobe, gemessen bei konstanten chromatographischen Bedingungen.

Als Fluorimeter verwenden wir das FS 970 (Kratos-Schoeffel-Instruments). Dieses Spektralfluorimeter ist mit variabler Anregungswellenlänge über einen Gittermonochromator und sekundärseitigen Filtern ausgestattet. Die Energie der benutzten 40-Watt-Deuteriumlampe reichte in den meisten Fällen für die Fluoreszenzanregung aus. Die apparativen Parameter sind der Legende zur Abbildung 20 zu entnehmen.

Da die Emissionswellenlänge im UV-Bereich liegt, mußten wir das Sekundärfilter (= Kantenfilter) weglassen.

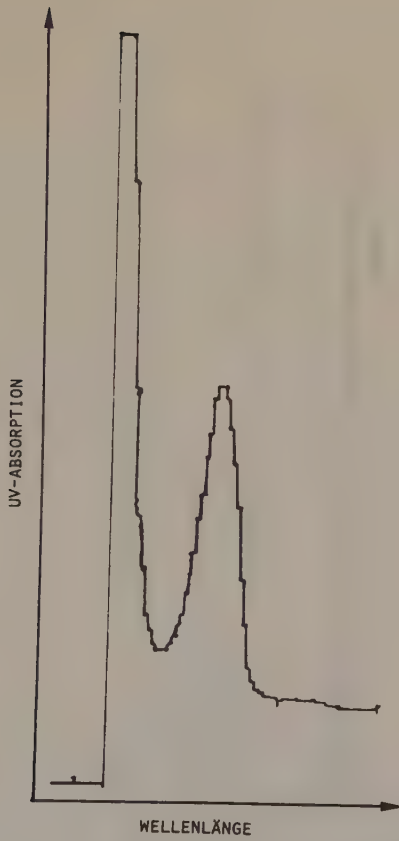


Abbildung 18: Scan eines Phenol-Peak mit den Absorptions-
maxima bei 215 nm und 270 nm

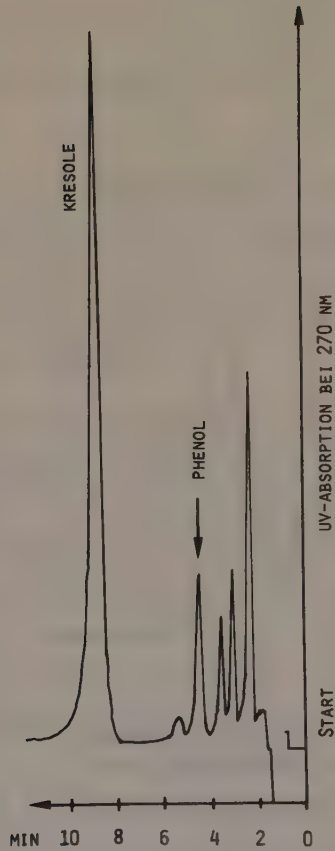


Abbildung 19: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Urin-
probe bei photometrischer Detektion
($\lambda = 270 \text{ nm}$)

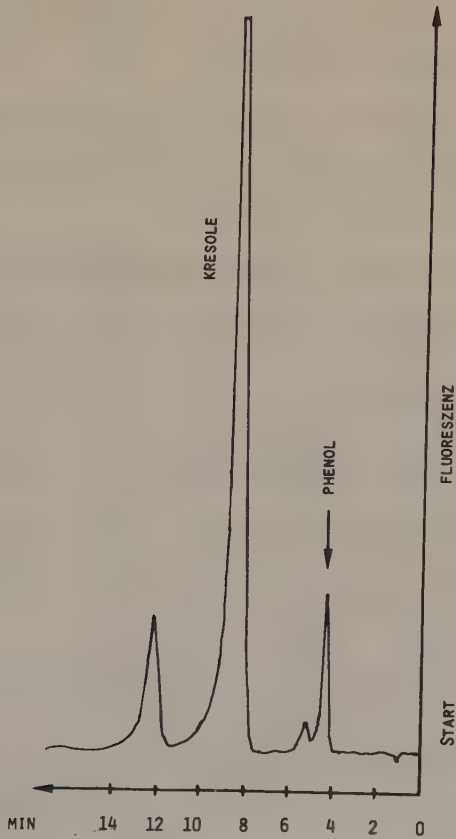


Abbildung 20: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Urinprobe bei fluorimetrischer Detektion (Anregungswellenlänge: 270 nm; Kantenfilter: keiner; injiziertes Volumen: 10 μ l)

Dennoch reduziert sich die Vielzahl der Peaks auf 4, was eine Erhöhung der Selektivität gegenüber der Messung im Durchlicht bedeutet.

Die Nachweisgrenzen bei dieser fluorimetrischen Messung liegen für das Phenol um circa den Faktor 10 niedriger als bei der Photometrie.

Spektralfluorimeter mit Xenon-Lampen können wegen ihrer hohen Anregungsenergie von bis zu 450 Watt (z.B. das JY der Firma JSA) sowohl primär als auch sekundärseitig mit Monochromatoren in Form von holographischen Gittern arbeiten. Benutzt man ein solches Spektralfluorimeter für eine Phenol-Analyse, so bleiben im Chromatogramm einer Urinprobe nur noch 3 Peaks übrig. Dies bedeutet durch den Einsatz eines Sekundärgitters eine weitere Erhöhung der Selektivität.

Die Nachweisempfindlichkeit für das Phenol bei einem gleichen Peak/Rausch-Verhältnis konnte gegenüber dem Durchlicht um zwei Zehnerpotenzen verbessert werden. Exemplarisch ist ein Chromatogramm in Abbildung 21 dargestellt.

Die ermittelten Werte für die analytische Zuverlässigkeit des Verfahrens und die Nachweisgrenze genügen den Ansprüchen, welche an ein Routineverfahren zu stellen sind.

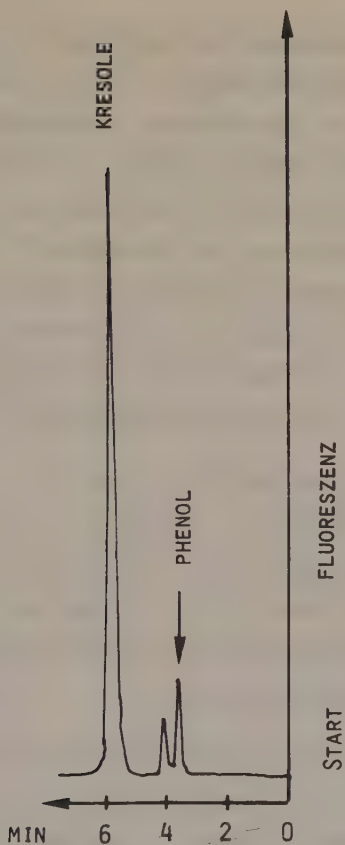


Abbildung 21: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Urinprobe bei fluorimetrischer Detektion mit holographischen Gittern (Spektralfluorimeter: IY3; Anregungswellenlänge 272,1 nm, Emissionswellenlänge: 301,0 nm; injiziertes Volumen: 2 μ l)

Nach DIRMKIS (1974) kommen in Normalurinen eine Vielzahl von phenolischen Verbindungen vor. Wir haben daher die Spezifität des beschriebenen Verfahrens gegenüber den Kresolen, Resorzin, Chinon, 2,6-Xylenol und Gujacol getestet. Gegen diese und ähnliche Substanzen messen die herkömmlichen Verfahren oft nicht spezifisch genug und unterliegen somit Störeinflüssen (DIRMKIS 1974). Die photometrischen Verfahren von BARDODEJI (1968) und ANGERER (1978) sind z.B. gegenüber Gujacol und m- und p-Kresol störanfällig.

Zur weiteren Spezifitätsüberprüfung haben wir von der Möglichkeit der Aufnahme von UV-Spektren im "Stop Flow"-Verfahren Gebrauch gemacht. Das im Scan erhaltene Spektrum vom Phenolpeak einer nicht mit Benzol belasteten Normalperson ist identisch mit dem Spektrum eines Peaks eines wässrigen Phenolstandards.

Des weiteren wurden 114 Urine mit Phenolkonzentrationen sowohl im Normbereich als auch im Bereich der arbeitsmedizinischen Grenzwerte einmal mit dem HPLC-Verfahren, zum anderen mit der von BARDODEJI (1968) beschriebenen Methode gemessen. Der Korrelationskoeffizient liegt bei $r = 0,87$.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, daß Phenol im Urin über eine Probenaufarbeitung mit Wasserdampfde-

stillation, einer hochdruckflüssigkeitschromatographischen Trennung und einer photometrischen bzw. fluorimetrischen Detektion nachgewiesen werden kann. Für eine Reihe anderer, wasserdampf-flüchtiger Substanzen läßt sich eine Modifikation des beschriebenen Verfahrens unter Änderung der mobilen Phase und der Detektionswellenlänge sicherlich einsetzen.

2.3. Direkte, differentielle Bestimmung von Hippursäure und Methyl-Hippursäure-Isomeren im Urin

2.3.1. Einleitung

Toluol und Xylol werden nach ihrer Aufnahme im menschlichen Körper größtenteils zu Hippursäure (HA) bzw. zu den entsprechenden Methylhippursäuren (MHA) metabolisiert (OGATA et al. 1971, MIKULSKI et al. 1972, SEDIVEK und FLEK 1976 a, ANGERER 1979). Die Ausscheidung dieser Substanzen erfolgt im Harn. In Abbildung 22 ist das Metabolisierungsschema von Toluol dargestellt. Bei Xylo-
len wird nur eine CH_3 -Gruppe oxidiert, die andere bleibt beim Abbau unverändert erhalten. Es werden somit die o-, m- und p-Methylhippursäuren gebildet.

Bei durch Toluol und Xylole verursachten Erkrankungen müssen zwei Verlaufsformen unterschieden werden:

Das Krankheitsbild bei Toluolvergiftung

- a) Akute Vergiftung, wobei die narkotische Wirkung mit der Gefahr einer zentralen Atemlähmung ausgeprägter in Erscheinung tritt als bei Benzol.

Wirkungen auf das ZNS

Ebenso wie bei der Benzolvergiftung kommt es hier zu Praenarkoseerscheinungen mit Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwächegefühl, Benommenheit, Gleichgewichts-

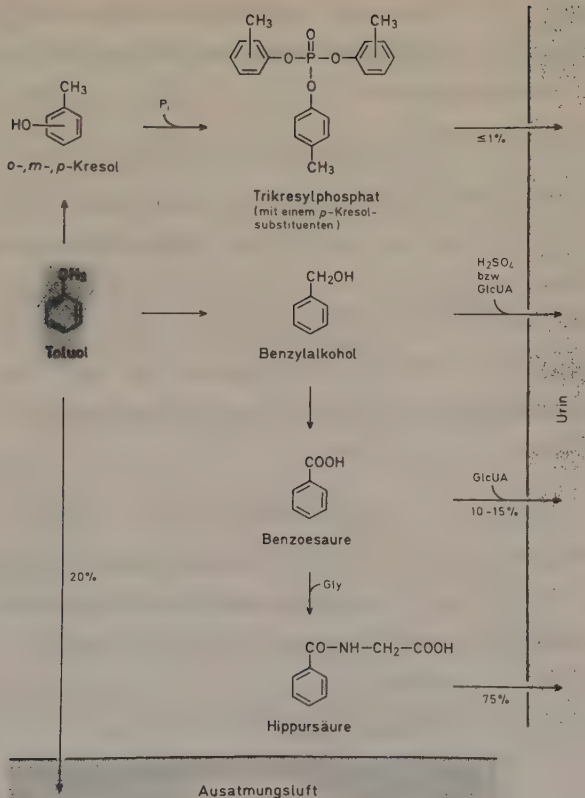


Abbildung 22: Metabolisierungsschema von Toluol (nach VALENTIN 1979)

Sensibilitäts- und Koordinationsstörungen. Mit steigender Expositionsdauer und Intensität wird bei Verstärkung der vorstehend beschriebenen Symptome das Exzitationsstadium mit Erregungs- oder Rauschzuständen sowie möglichen Konvulsionen erreicht.

Eine narkotische Wirkung mit Bewußtseinsverlust und unter Umständen dem Tod kann die Folge extremer Benzolvergiftung sein. Die Symptome des Praenarkosestadiums können auch noch mehrere Tage nach der Exposition bestehen bleiben. Einwirkungen von Benzol auf die Augen führen zu Irritationen der Conjunctiva und Cornea.

Die Belastung des Respirationstraktes ist durch eine Irritation der Schleimhäute gekennzeichnet. Auch treten zentralnervös-bedingte Regulationsstörungen auf, die ebenso Kennzeichen einer Benzolbelastung des Herz-Kreislauf-Gefäßsystems sind. Vasodilatation mit petechialen Blutungen sind u.a. die Folge.

b) Chronische Vergiftung

Die Allgemeinsymptome decken sich mit denen einer Benzolvergiftung. Wichtig jedoch ist, daß die Symptome - anders als bei Benzol - nach Wegfall der Exposition wieder rasch abklingen.

Im Unterschied zu Benzol kann eine Schädigung des hä-

matopoetischen Systems nicht mit Sicherheit auf Toluoleinwirkung zurückgeführt werden. Vielmehr macht man dafür Benzolverunreinigungen verantwortlich.

Schädigungen des weißen Blutbildes, vor allem Leukozytosen, werden jedoch im Zusammenhang mit Toluol beschrieben.

Auch eine Einschränkung der Phagozytoseeigenschaft der Leukozyten wird diskutiert.

Neben den bereits bei der akuten Vergiftung beschriebenen Reizungen der Schleimhäute treten auch Dermatitis der äußeren Haut auf.

An sonstigen Symptomen finden sich Magen-Darm-Störungen mit Hepatomegalie sowie psychischen Verhaltensstörungen bis hin zur schizophrenen Psychose.

Das Krankheitsbild bei Xylolvergiftung

- a) Bei der akuten Vergiftung steht wie bei Toluol die narkotische Wirkung im Vordergrund. Bei Xylol-Vergiftung tritt diese jedoch erst später ein, hält aber länger an. Die Narkosewirkung ist größer als bei Toluol und Benzol.

Die Auswirkungen auf ZNS, Auge, Respirationstrakt und Herz-Kreislauf-Gefäßsystem sind denen des Tolu-

ol ähnlich.

- b) Die toxische Wirkung von Xylol bei chronischer Belastung wird geringer eingeschätzt als die von Toluol.

Es finden sich jedoch wieder die Allgemeinsymptome, wie Mattigkeit, Benommenheit, Reizbarkeit, Verwirrung, Schlafstörungen, Übelkeit, Appetitlosigkeit und Augenflimmern.

Auswirkungen auf das hämatopoetische System, vor allem Störungen des weißen Blutbildes werden beschrieben. Eine Einwirkung auf das rote Blutbild schreibt man Verunreinigungen durch Benzol zu.

Im übrigen finden sich wieder gastrointestinale Störungen, Alkoholintoleranz, neurasthenische Beschwerden, psychische Verhaltensstörungen und Parästhesien. An den Augen sind Vakuolisierung der Cornea beschrieben. Mit Dermatiden ist bei längerem Kontakt zu rechnen.

Im Rahmen der arbeitsmedizinischen Überwachung von Toluol- und Xylol-exponierten Personen ist die Erfassung der Metabolite im Urin ein anerkanntes Verfahren (PAGNOTTO und LIEBERMANN 1967, IKEDA und OHTSUJI 1969, OGATA et al. 1970, SEDIVEC und FLEK 1976 b, SUGIHARA und OGATA 1978).

Die häufige Verwendung dieser Lösungsmittel in der Industrie erfordert für das arbeitsmedizinisch-toxikologische Laboratorium zur Erfüllung seiner Aufgaben eine einfache und schnelle Routinemethode.

Zur quantitativen, differentiellen Analyse der Hippursäure und der drei Methyl-Hippursäure-Isomeren im Urin wurde bisher die Gaschromatographie eingesetzt (SEDIVEC und FLEK 1970, BUCHET und LAUWERYS 1973, ENGSTRÖM et al. 1976, CAPEROS und FERNANDEZ 1977, KIRA 1977, ZSCHIESCHE et al. 1978/79, ROOSMALEN und DRUMMOND 1978). Neuerdings bietet sich die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie mit ihren guten Trenneigenschaften zur Quantifizierung dieser Substanzen an. In der Literatur sind mehrere Verfahren zur Bestimmung von Hippursäure im Urin mit der HPLC beschrieben. Bisher ist es unseres Wissens nicht gelungen, ohne eine zeitraubende Derivatisierung die MHA-Isomeren zu trennen (OGATA et al. 1977, MATSUI et al. 1977, GOSSLER et al. 1977, MATSUI et al. 1978). Wir haben daher ein einfaches, hochdruckflüssigkeitschromatographisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hippursäure und Methylhippursäure-Isomeren erarbeitet.

2.3.2. Methodik

2.3.2.1. Prinzip des Verfahrens

Das Verfahren erlaubt die quantitative Bestimmung der Metaboliten von Toluol bzw. Xylolen nach Direktinjektion verdünnter Urinproben. In einer chromatographischen Bestimmung lassen sich isokratisch die Hippursäure (HA), die o-Methylhippursäure (o-MHA) und die Summe aus m- und p-Methylhippursäure (m- und p-MHA) bestimmen.

Unter den angegebenen Chromatographiebedingungen kann man m- und p-Methylhippursäure nicht trennen. Eine chemische Ermittlung der Konzentration ist jedoch durch zwei Injektionen jeder Probe möglich. Das Chromatogramm wird hierbei mit zwei verschiedenen Wellenlängen aufgezeichnet. Ersatzweise lassen sich auch zwei hintereinandergeschaltete Detektoren bei unterschiedlichen Wellenlängen betreiben. Für die Berechnung der Werte benutzt man die Tatsache, daß beide Isomeren bei 218 nm gleiche und bei 250 nm sehr unterschiedliche Extinktionskoeffizienten besitzen. In den Abbildungen 23 - 26 sind die UV-Spektren von o-, m- und p-Methylhippursäurepeaks und von einem Hippursäurepeak abgebildet. Als Trennsystem haben wir die Reversed Phase-Chromatographie mit einer mobilen Phase aus einem Methanol/Wasser-Gemisch eingesetzt (GOSSLER et al. 1979).

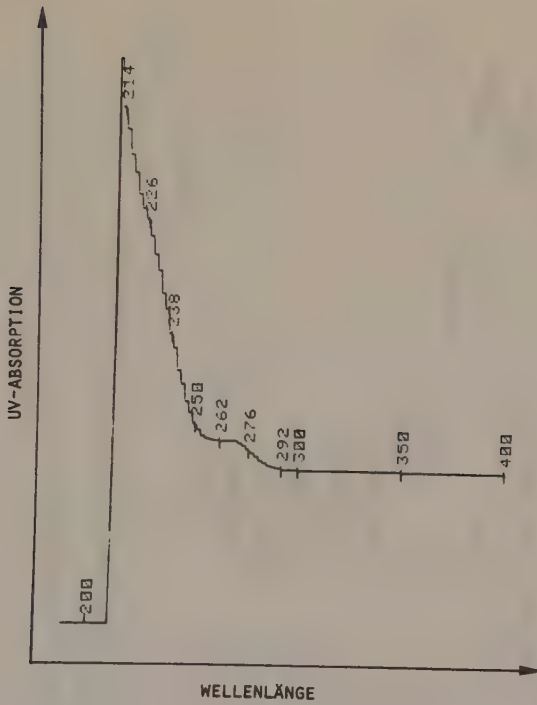


Abbildung 23: UV-Spektrum von einem o-Methylhippursäure-Peak

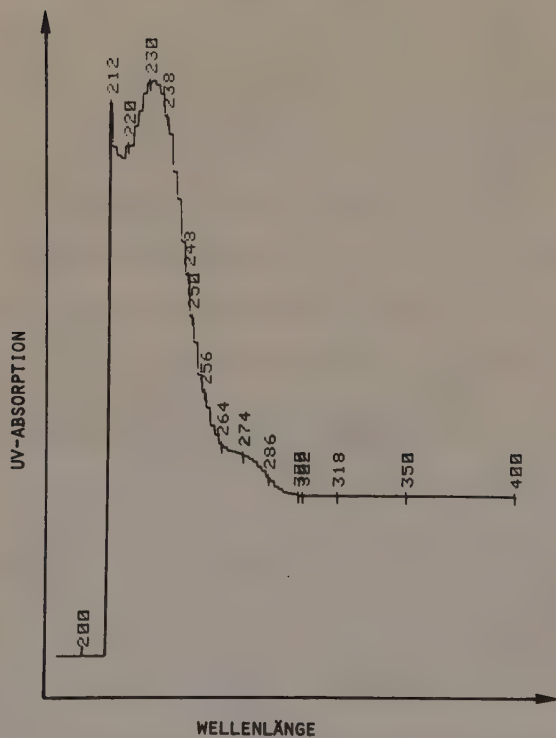


Abbildung 24: UV-Spektrum von einem m-Methylhippursäure-Peak

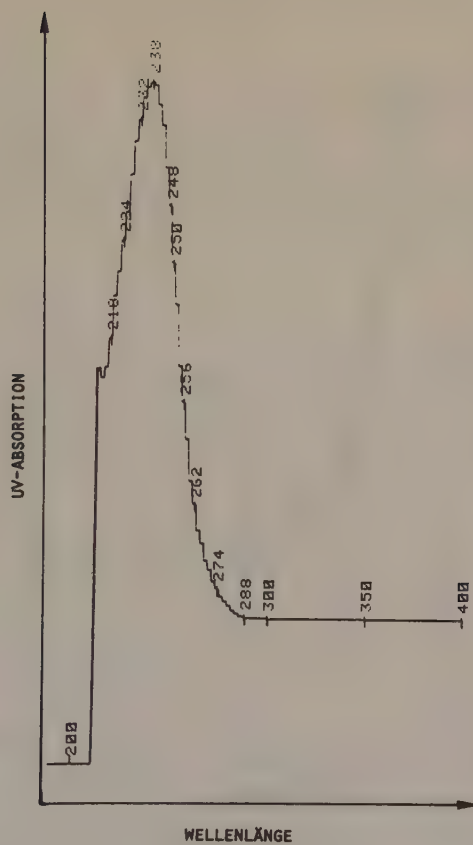


Abbildung 25: UV-Spektrum von einem p-Methylhippursäure-Peak

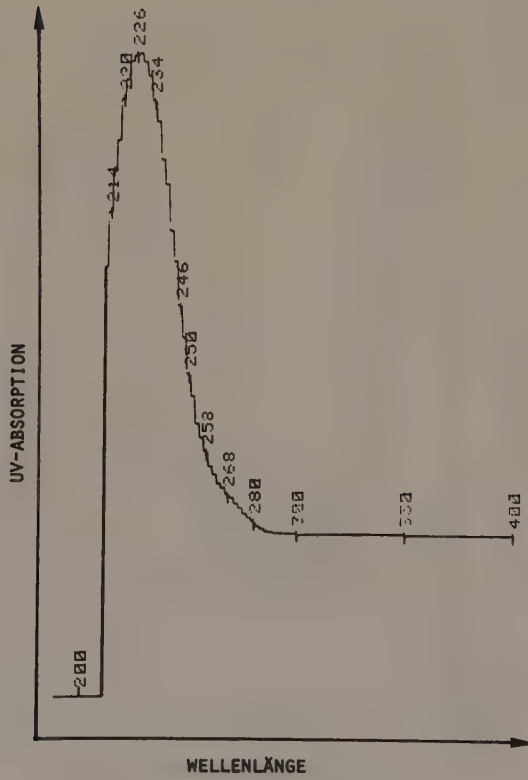


Abbildung 26: UV-Spektrum von einem Hippursäure-Peak

2.3.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett-Packard
(HP), Modell 1084 B

Detektor: Variabler Wellenlängendetektor Hewlett Packard
(HP)

Chemikalien:

Hippursäure (Fa. Merck)

o-, m-, p-Methylhippursäure (dargestellt nach INGERSOLL
und BABCOCK 1943).

Essigsäure p.A. 100 % (Fa. Merck)

Methanol p.A. (Fa. Merck)

Aqua dest.

NaH_2PO_4 p.A. (Merck)

Na_2HPO_4 p.A. (Merck)

Standard-Lösungen:

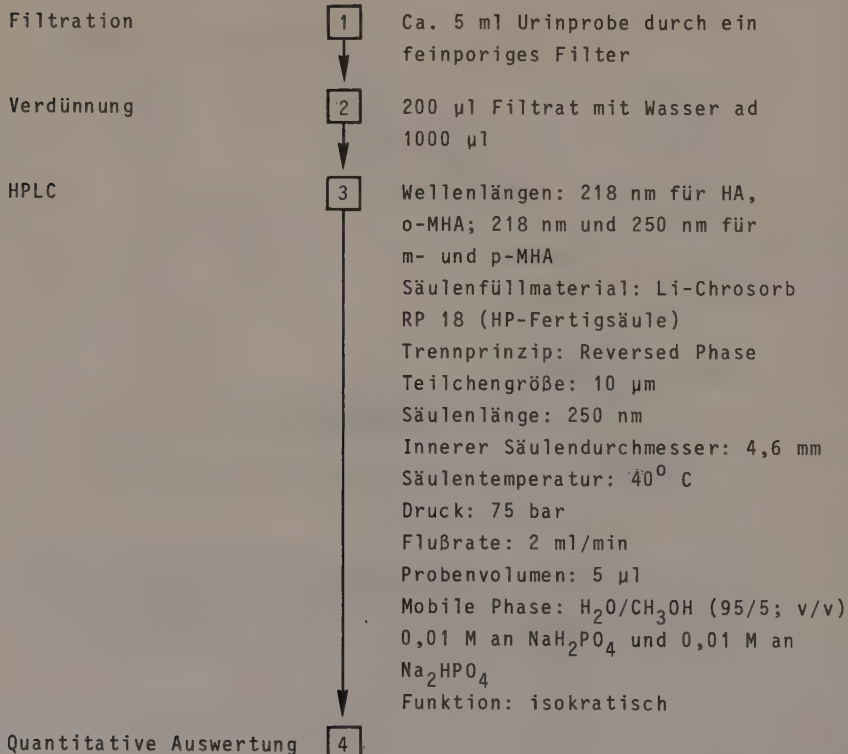
a) jeweils 8 mg HA, o-MHA und m-MHA werden mit 2 ml
frischem, filtrierten "Normalurin" versetzt und ad
10 ml mit Aqua dest. gelöst

b) jeweils 8 mg HA, o-MHA und p-MHA werden mit 2 ml
frischem, filtrierten "Normalurin" versetzt und ad
10 ml mit Aqua dest. gelöst.

2.3.2.3. Probennahme und Probenlagerung

Die Urinproben werden ohne irgendwelche Zusätze bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt. Für längere Aufbewahrungszeiten empfiehlt sich die Lagerung in der Tiefkühltruhe. Ebenso können die Urinverdünnungen konserviert werden. Eichverdünnungen lassen sich durch Einfrieren und sachgemäßes Auftauen mehrmals wiederverwenden.

2.3.2.4. Arbeitsvorschrift



2.3.2.5. Eichung

Für die Erstellung von Eichkurven haben wir, wie bereits beschrieben, Normalurin mit definierten Mengen an Hippursäure bzw. Methylhippursäuren versetzt. Während die Hippursäure, die o-MHA und die p-MHA in einer Lösung gemessen werden können, muß die m-MHA getrennt untersucht werden.

In den Eichkurvendiagrammen (Abb. 27 und 28) wird die Peakhöhe als Ordinate gegen die Hippur- bzw. Methylhippursäurezusätze pro ml Urin in der Abszisse eingetragen. Im Falle der Hippursäure ist zu berücksichtigen, daß Normalurine Hippursäure enthalten. Durch eine Parallelverschiebung der Eichkurve ist der "normale" Hippursäuregehalt des Urins zu subtrahieren. Aus diesen Eichkurven werden die Faktoren als Konzentration pro Peakflächeneinheit bei 218 nm bzw. 250 nm ermittelt.

Unter den von uns gewählten Analysenbedingungen ist eine Trennung der m- und p-Methylhippursäure nicht möglich. Eine Berechnung der Konzentrationen der beiden Einzelkomponenten läßt sich trotzdem durch die Registrierung bei zwei verschiedenen Wellenlängen durchführen. Es wird dabei die Tatsache ausgenutzt, daß beide Isomere bei einer Anregung von 218 nm sehr ähnliche, bei 250 nm aber sehr unterschiedliche Extinktionskoeffizienten besitzen.

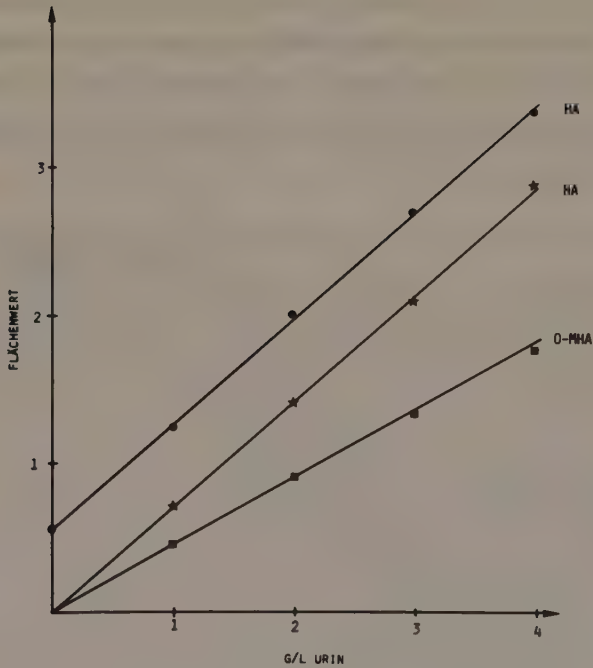


Abbildung 27: Eichkurve für die quantitative Bestimmung von Hippursäure und o-Methylhippursäure, gemessen bei einer Wellenlänge von 218 nm
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

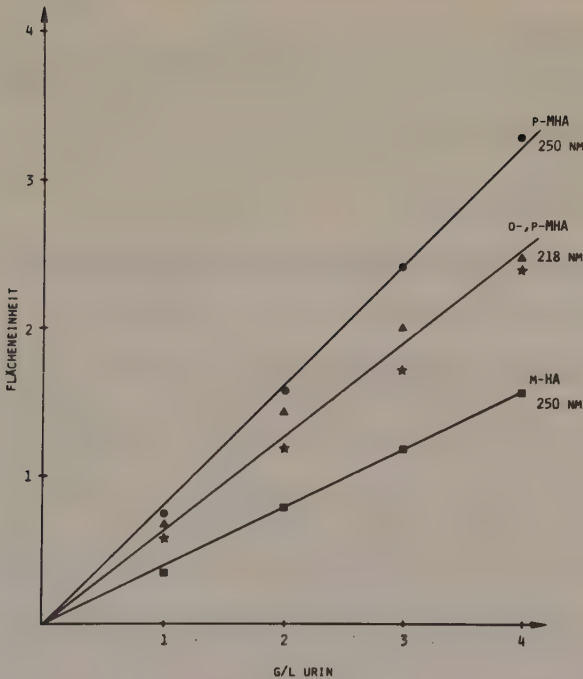


Abbildung 28: Eichkurve für die quantitative Bestimmung von m- und p-Methylhippursäure, gemessen bei Wellenlängen von 218 nm bzw. 250 nm
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

Für die Bestimmung der einzelnen Komponenten ergibt sich folgender Berechnungsmodus:

Hippursäure:

Die Konzentration wird direkt mit Hilfe der Eichgeraden ermittelt (Abb. 27).

o-Methylhippursäure:

Die Konzentration kann direkt aus dem Eichdiagramm abgelesen werden (Abb. 27).

m-, p-Methylhippursäure:

Die Konzentrationen lassen sich wie folgt berechnen:

$$a_{250} = \frac{c_m}{f_{250m}} + \frac{c_p}{f_{250p}} \quad (I)$$

$$a_{218} = \frac{c_m}{f_{218m}} + \frac{c_p}{f_{218p}} \quad (II)$$

Daraus ergibt sich:

$$c_p = \frac{f_{250} \cdot a_{250} - f_{218} \cdot a_{218}}{\frac{f_{250m}}{f_{250p}} - \frac{f_{218m}}{f_{218p}}}$$

$$c_m = f_{250m} \cdot a_{250} - \frac{f_{250m}}{f_{250p}} \cdot c_p$$

c_m, c_p : m- bzw. p-MHA-Konzentrationen in mg/ml Urin

a_{218}, a_{250} : Peakflächen für m-, p-MHA

$f_{218}, f_{218p}, f_{250m}, f_{250p}$: Faktoren, welche die Konzentration an m- bzw. p-MHA in mg/ml Urin pro Peakflächeneinheit bei 218 nm bzw. 250 nm angeben. Diese Werte können den Eichkurven entnommen werden (Abb. 28).

2.3.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Die analytischen Zuverlässigkeitskriterien der Methode entsprachen den Erfordernissen einer Routinemethode des arbeitsmedizinisch-toxikologischen Laboratoriums. Die Präzision in der Serie wurde durch eine 5-malige Analyse einer Urinprobe von einer Person mit beruflicher Toluol- und Xylol-Belastung ermittelt. Für die Hippursäuremessung ergab sich bei einem mittleren Gehalt von 0,37 mg/ml ein Variationskoeffizient von 8 %. Eine Varianz von 9 % errechneten wir für die Analyse der m-, p-MHA-Isomeren bei einer Ausscheidungsrate von 0,68 mg/ml.

Auf eine Prüfung des Variationskoeffizienten für das o-Isomere wurde verzichtet, da die Konzentration sehr niedrig lag.

Die Prüfung der Richtigkeit erfolgte durch Wiederauf-

findungsversuche. Dies war insbesondere von Interesse für die Bestimmung der m- und p-MHA. Hierfür setzten wir Normalurine mit verschiedenen Mengen an m- und p-MHA ein. Die Messung der Substanzen wurde mit dem 2-Wellenlängenverfahren durchgeführt.

Es ergaben sich folgende Werte:

zugesetzte Menge in mg/ml		gefundene Menge in mg/ml	
m-MHA	p-MHA	m-MHA	p-MHA
0,11	0,61	0,17	0,60
0,23	0,61	0,29	0,59
0,46	0,41	0,50	0,39
0,68	0,20	0,72	0,20

Aus den Ergebnissen errechneten wir eine mittlere Wiederauffindungsrate für m-MHA von 124 %, für p-MHA von 98 %.

Die Nachweisgrenzen des vorgestellten Verfahrens betrugen sowohl für die Hippursäure als auch die Methylhippursäure circa 10 µg Carbonsäure/ml Urin. Als Nachweisgrenze wurde dabei die dreifache Standardabweichung des Grundrauschens definiert.

2.3.3. Diskussion

Das Chromatogramm der Urinprobe einer mit Toluol und Xylenen beruflich belasteten Person haben wir in Abbildung 29 dargestellt. Die Messung erfolgte bei 218 bzw. 250 nm. Während die Hippursäure und die o-MHA gut getrennt sind, besitzen die beiden anderen MHA-Isomeren die gleiche Retentionszeit.

Die hier vorgestellte Methode erfüllt die Kriterien der analytischen Zuverlässigkeit und der Praktikabilität für eine Routinemethode in der arbeitsmedizinischen Toxikologie. Es können täglich pro Person circa 60 Analysen durchgeführt werden. Dies beinhaltet sowohl Doppelbestimmung als auch die statistische Qualitätssicherung und die tägliche Eichung.

Die in der Literatur beschriebenen hochdruckflüssigkeitschromatographischen Methoden zur Bestimmung von Hippursäure und den Methylhippursäuren im Urin benötigen meist eine Probenvorbereitung. Die Metabolite werden extrahiert und zum Teil anschließend derivatisiert (SUGIHARA und OGATA 1978, MATSUI et al. 1977).

OGATA et al. (1979) verwenden ebenfalls die direkte Injektion für die hochdruckflüssigkeitschromatographische Analyse. Mit dem von ihnen entwickelten Verfahren ist jedoch nur die Hippursäure und die m-Methylhippursäure

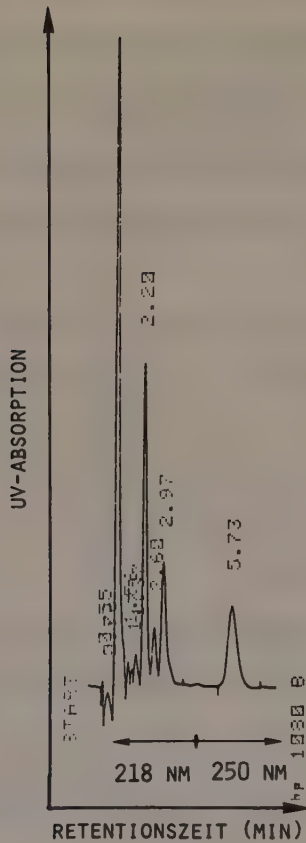


Abbildung 29: Chromatogramm der Urinprobe einer mit Toluol und Xylenen exponierten Person. Hippursäure (HA) 2,20 min., o-Methylhippursäure (o-MHA) 2,97 min., m- und p-Methylhippursäure (m-, p-MHA) 5,73 min.

zu bestimmen. Unseres Wissens ist es nur SUGIHARA und OGATA (1978) gelungen, durch eine Benzoylierung die Isomeren m- und p-MHA zu trennen. Unser Verfahren verwendet ebenfalls die Direktinjektion. Die Trennung der Isomeren erfolgt durch zweifache Injektion jeder Probe und Aufnahme der Spektren bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Eine differentielle Bestimmung der Isomerenkonzentrationen im Urin ist dann rechnerisch möglich.

Inwieweit eine differentielle Bestimmung der Methylhippursäuren bei arbeitsmedizinischen Aufgabenstellungen notwendig ist, wird derzeit noch diskutiert. Kommerziell erhältliches Xylol enthält 15 % der o-, 53 % der m- und 23 % der p-Isomeren (SUGIHARA und OGATA 1978). Nach GERARDE (1962) beträgt die Isomeren-Verteilung 20 % o-, 44 % m- und 20 % p-Xylol. Daraus geht hervor, daß das m-Isomere am bedeutsamsten ist, während die o-Form eine untergeordnete Rolle spielt. In vivo-Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, daß die p-Form toxischer ist als die 2 anderen (SUGIHARA und OGATA 1978). Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der eingesetzten Xylole und der verschiedenen Toxizität der Isomeren ist insbesondere bei wissenschaftlichen Fragestellungen eine differenzierte Bestimmung der Methylhippursäuren von Interesse.

Eigene Untersuchungen an 18 beruflich gegenüber Xylole

exponierten Personen haben gezeigt, daß ein Verhältnis der m- zur p-MHA von circa 3 : 1 besteht. Die Ausscheidungsrate des o-Isomeren lag zum Teil unterhalb der Nachweisgrenze. In Tabelle 4 sind die von uns gemessenen Verteilungsmuster zusammengestellt.

Wir sind der Meinung, daß für die Routineüberwachung Xylol-exponierter Personen die Erfassung der Gesamt-Methylhippursäure-Ausscheidung ausreicht. Die quantitative Bestimmung wird unter den angegebenen Arbeitsbedingungen praktiziert. Die photometrische Detektion wird nur bei 218 nm durchgeführt. Die Quantifizierung kann mit Hilfe der m-MHA Eichkurve erfolgen. Dies ist zum einen dadurch berechtigt, daß das m-Isomere die Hauptfraktion darstellt und zum anderen die Eichfaktoren für die m- und p-MHA annähernd gleich sind. Der derzeit diskutierte arbeitsmedizinisch tolerierbare Grenzwert von 2,5 g/l für die Gesamtausscheidung der Methylhippursäuren bei Personen mit beruflicher Xylol-Exposition erfordert noch eine Abklärung, ob er im Hinblick auf chronische Gesundheitsschäden vertretbar ist (LAUWERYS 1975, SCHALLER et al. 1979).

Person	HA	o-MHA	m-MHA	p-MHA	Σ MHA
1	0,38	0,06	0,40	0,12	0,58
2	0,21	< 0,01	0,03	0,01	0,04
3	0,22	0,10	0,52	0,13	0,75
4	1,95	0,05	0,65	0,20	0,87
5	0,13	0,02	0,10	0,03	0,15
6	0,15	0,02	0,13	0,03	0,18
7	0,40	0,22	1,21	0,33	1,76
8	0,92	0,09	0,65	0,18	0,92
9	0,19	0,01	0,07	0,02	0,10
10	0,67	< 0,01	0,03	0,01	0,04
11	0,21	0,11	0,58	0,15	0,84
12	0,22	0,05	0,25	0,07	0,37
13	1,85	< 0,01	0,13	0,03	0,16
14	0,57	< 0,01	0,14	0,05	0,19
15	0,77	< 0,01	0,13	0,03	0,16
16	0,72	< 0,01	0,07	0,01	0,08
17	0,36	< 0,01	0,04	0,01	0,05
18	0,30	< 0,01	0,03	0,01	0,04

Tabelle 4: Hippur-(HA) und Methylhippursäure-(MHA)-Ausscheidungen im Urin (mg/ml) von 18 gegenüber Toluol und Xylolen exponierten Personen

2.4. Quantitative Bestimmung der Styrol-Metaboliten Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure im Urin

2.4.1. Einleitung

Der Kunststoff Polystyrol gewinnt in der modernen Arbeitswelt eine ständig steigende Bedeutung. Nach BARDODEJI und BARDODEJOVA (1970) werden pro Jahr mehrere Millionen Tonnen Styrol produziert. Die industrielle und gewerbliche Verarbeitung des Ausgangsproduktes Styrol erfolgt hauptsächlich bei der Herstellung von Kunststoffen, zur Erzeugung von synthetischem Kautschuk, beim Einsatz als polymerisierbares Lösungsmittel, für andere organische Synthesen und in der Parfümerie und Pharmazie. In der Kunststoffindustrie wird Styrol in erster Linie zur Produktion von Polystyrol verwandt. Weltweit stellt man dieses Polymerisat in Millionen von Tonnen her.

Styrol kann vom menschlichen Organismus durch Einatmen der Dämpfe, über den Gastrointestinaltrakt und durch die intakte Haut resorbiert werden. Ein Teil des aufgenommenen Styrols wird unverändert mit der Atemluft wieder abgegeben. Etwa 50 - 90 % der resorbierten Menge werden jedoch metabolisiert. Durch Einwirkung mikrosomaler NADPH erfolgt eine Oxidation zu Styrolepoxid mit anschließender Hydrolyse zu Phenylglykol und Umwandlung in Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure. Die glei-

chen Substanzen werden im Urin ausgeschieden (Abb. 30). Daneben kann noch Hippursäure entstehen.

Bei durch Styrol verursachten Erkrankungen müssen zwei Verlaufsformen unterschieden werden:

a) akute Vergiftung

Abhängig von den Expositionsbedingungen kommt es bei Auswirkungen auf das ZNS zur Praenarkose mit den bekannten Erscheinungen wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindelgefühl, Gleichgewichtsstörungen, Rauschzuständen und Neigung zu Depressionen.

Im Unterschied zum Tierexperiment konnten bis heute beim Menschen keine weitergehenden Symptome wie Koma mit unter Umständen letalem Ausgang beobachtet werden.

Einwirkungen auf die Augen können Irritationen der Conjunctiva und Cornea mit erhöhtem Tränenfluß hervorrufen.

Der Respirationstrakt wird durch Irritationen der Schleimhäute verbunden mit einer Steigerung der Sekretion geschädigt. Sonstige Symptome wie Störungen des Verdauungssystems mit Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen werden ebenfalls beschrieben.

b) Bei der chronischen Vergiftung können die Bilder der akuten Vergiftung - jedoch in abgeschwächter Form -

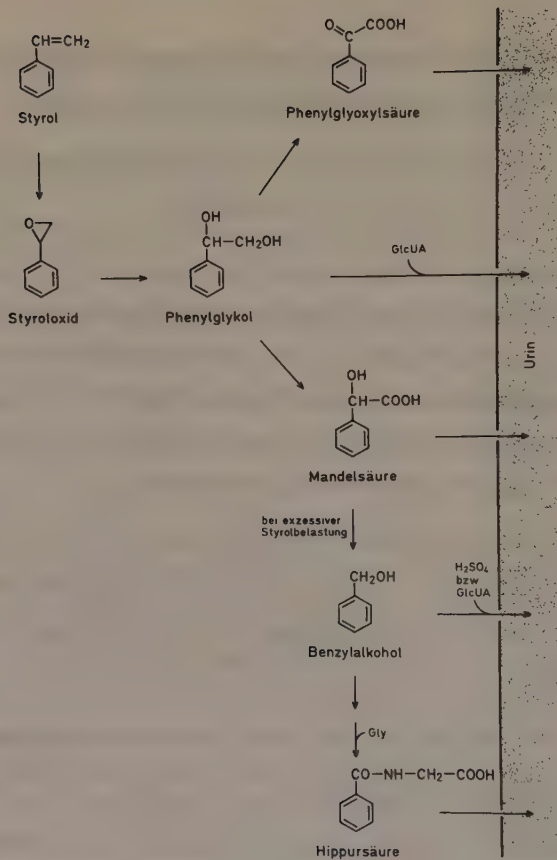


Abbildung 30: Metabolisierung von Styrol
(nach VALENTIN et al. 1979)

auftreten. Zusätzlich werden Reizerscheinungen an der Haut beobachtet, die zu sekundären Superinfektionen neigen.

Durch den Nachweis einer vermehrten Ausscheidung von Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure als Stoffwechselprodukte im Urin kann unter anderem die Exposition beurteilt werden.

Für die quantitative Bestimmung von Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure aus Urin stehen hochdruckflüssigkeitschromatographische und gaschromatographische sowie photometrische Verfahren zur Verfügung. Eine detaillierte Aufstellung der verschiedenen analytischen Möglichkeiten zur quantitativen Bestimmung von Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure findet sich bei ZSCHIESCHE et al. (1978/1979).

Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie ist neben der Gaschromatographie die Methode der Wahl zur Bestimmung dieser Metaboliten.

2.4.2. Methodik

2.4.2.1. Prinzip des Verfahrens

Um gute chromatographische Trennungen zu erzielen, müssen die beiden Metaboliten in die entsprechenden Methylester übergeführt werden. Vor der Analyse ist jedoch

noch eine oxidative Decarboxylierung der Phenylglyoxilsäure zu Benzoesäure (BA) notwendig. Phenylglyoxilsäure ist nämlich chemisch instabil und läßt sich nicht gezielt und quantitativ in Derivate umwandeln (ZSCHIESCHE et al. 1978/1979).

Da einige alkalische und neutrale Substanzen die chromatographische Trennung der Analyten stören würden, sind mehrere Extraktions- und Reextraktionsschritte zur Entfernung der Störsubstanzen nötig. Die Präzision der analytischen Bestimmung wird durch das Mitführen eines internen Standards durch die gesamten Aufarbeitungsschritte gesichert.

Für die chromatographische Analyse kommt die Reversed-Phase-Trenntechnik und eine Gradientenelution mit Wasser/Methanol zum Einsatz. Zur Detektion benutzt man ein Spektralphotometer.

2.4.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

Detektor: Variabler Wellenlängendetektor Hewlett Packard (HP)

Chemikalien:

Mandelsäure (MA) (Merck)

Phenylglyoxilsäure (PGA) (Merck)

Phthalsäure (Merck)

Perhydrol p.A. (Merck)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.A. (Merck)

6 M HCl p.A. (Merck)

Essigsäureethylester p.A. (Merck)

1 M NaOH p.A. (Merck)

Diethylether p.A. (Merck)

Diazomethan (Organikum 1977), etherische Lösung

Standard-Lösungen:

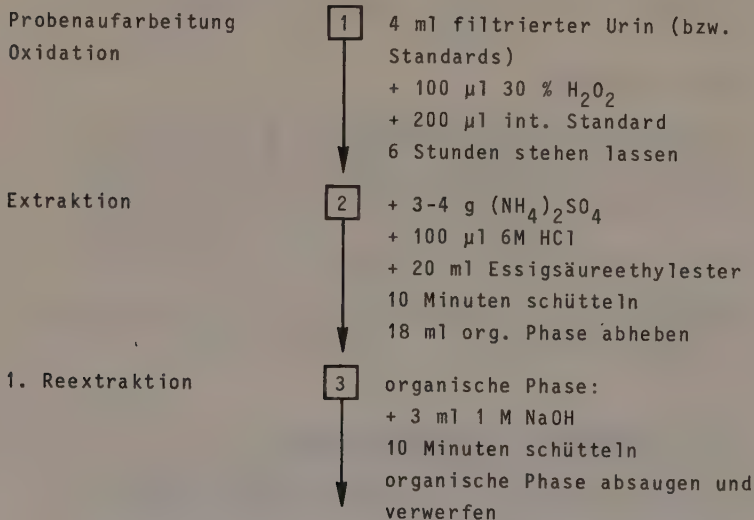
Jeweils 25 mg MA und 25 mg PGA werden in 25 ml Poolurin gelöst. Aus dieser Stammlösung werden dann mit Poolurin Verdünnungen hergestellt. Man mischt sich die Eichpunkte 0; 0,25; 0,5 und 1 mg MA oder PGA/l Urin. Der interne Standard besteht aus einer Lösung von 150 mg Phthalsäure/ 50 ml Methanol.

2.4.2.3. Probennahme und Probenlagerung

Die Urinprobe wird unter Umschwenken mit 30 %igem Wasserstoffperoxid versetzt. Zu 4 ml Urin sollten dabei 100 µl Perhydrol pipettiert werden. Das verwendete Perhydrol muß noch frisch und unzersetzt sein.

Bei dem so konservierten Probenmaterial findet beim Transport in das Labor keine Änderung des PGA- bzw. MA-Gehaltes statt. Vor der Analyse muß das Wasserstoffperoxid für die Umwandlung der PGA in die BA mindestens 6 Stunden eingewirkt haben. Bis zur Aufarbeitung können die Urinproben dann im Kühlschrank bei +4 °C oder für längere Zeiträume in der Tiefkühltruhe bei -20 °C gelagert werden.

2.4.2.4. Arbeitsvorschrift



2. Reextraktion

4

wässrige Phase:
+ 200 µl H_2SO_4 p.A.
+ 5 ml Essigsäureethylester
10 Minuten schütteln
4 ml org. Phase abheben und
aufbewahren
wässrige Phase:
+ 5 ml Essigsäureethylester
10 Minuten schütteln
org. Phase abheben

Derivatisierung

5

vereinigte organische Phasen
am Rotationsverdampfer ein-
dampfen
+ 2-3 ml etherische Diazome-
thanlösung
10 Minuten bei Raumtemperatur
stehen lassen
Lösungsmittel am Rotations-
verdampfer bei Raumtemperatur
abziehen
in 2 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50) auf-
nehmen

HPLC

6

Wellenlänge: 224 nm für MA
236 nm für int.
Standard und PGA
Säulenfüllmaterial: Li-Chrosorb^R
RP 18 (HP-
Fertigsäule)
Trennprinzip: Reversed Phase
Teilchengröße: 5 µm
Säulenlänge: 250 mm
Inn. Säulendurchmesser: 4,6 mm
Säulentemperatur: 40 °C
Druck: 170 bar

Durchfluß 1 ml/min
Probenmenge: 5 µl
Mobile Phase: H₂O und CH₃OH
Funktion: linearer Gradient
Start: 40 % CH₃OH
15 min: 90 % CH₃OH

Quantitative Auswertung

7

2.4.2.5. Eichung

Für die Erstellung von Eichkurven wurde Normalurin mit definierten Mengen an Mandel- bzw. Phenylglyoxilsäure versetzt und analog den Harnproben aufgearbeitet.

Die Eichkurven sind im Bereich von 0 bis 1 g/l linear. Im Falle der PGA muß berücksichtigt werden, daß Normalurine geringe Mengen an Benzoesäure enthalten können.

2.4.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Unter den von uns angegebenen apparativen und experimentellen Arbeitsbedingungen betragen die Nachweisgrenzen für Mandelsäure 30 mg/l Urin bzw. für Phenylglyoxilsäure 10 mg/l Urin. Durch den Einsatz größerer Urinvolumina können die Nachweisgrenzen noch etwas verbessert werden.

Die Präzision in der Serie wurde durch die 10-fach-Ana-

lyse einer Urinprobe eines Styrol-exponierten Arbeiters erstellt. Der Variationskoeffizient von 4 % für die Bestimmung der Mandelsäure liegt besser als der Wert von 8,5 % für Phenylglyoxilsäure. Wir führen dies auf den zusätzlich erforderlichen Oxidationsschritt bei der Bestimmung der BGA zurück.

Auf eine Prüfung der Richtigkeit durch Wiederauffindungsversuche wurde verzichtet, da für die Eichung der Urinproben definierte Metabolitenzusätze verwendet wurden. Ein Vergleich mit methanolischen Standardlösungen von Mandel- und Benzoesäuremethylestern ergab Wiederauffindungsraten von circa 50 %. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Eichstandards analog den Urinproben behandelt werden müssen. Auch muß ein interner Standard mitgeführt werden. Vergleichsanalysen von 24 Urinproben Styrol-belasteter Arbeiter mit einer gaschromatographischen Methode erbrachten einen Korrelationskoeffizienten von 0,98 für die Mandelsäure und 0,92 für Phenylglyoxilsäure (WILL et al. 1980). Das HPLC-Verfahren besitzt demnach eine gute Spezifität.

Diese wird bei der PGA-Analyse dadurch etwas eingeschränkt, daß Normalurinproben nachweisbare Mengen an Benzoesäure enthalten können. Verursacht wird dies durch die Einnahme von Medikamenten und durch den Gebrauch aromatischer Carbonsäuren als Konservierungsmittel. In eigenen umfang-

reichen Untersuchungen konnten wir eine maximale Basis-Konzentration von 25 mg Benzoesäure/l Urin finden. Diese Konzentration hat keinen Einfluß auf die diagnostische Validität des Parameters im Vergleich zu den Phenylglyoxilsäure-Mengen, die im Urin Styrol-exponierter Personen gefunden werden.

Über die Praktikabilität der Methode kann gesagt werden, daß eine Person in der Lage ist, 20 Analysen pro Tag auszuführen.

2.4.3. Diskussion

Zahlreiche Versuche mußten durchgeführt werden, um das beschriebene Analysenverfahren zu optimieren. Eine Derivatisierung der Säuren zu den entsprechenden Methyl-estern erwies sich als unumgänglich. Ohne diese Derivatbildung konnte keine befriedigende chromatographische Trennung der Mandelsäure von der in relativ hohen Konzentrationen vorliegenden Hippursäure (500 bis 3000 mg HA/l Urin) erzielt werden (Abb. 31).

Da außerdem in den Urinproben noch eine Vielzahl von neutralen Störsubstanzen vorlagen, haben wir diese durch Reextraktionsschritte entfernt. Das Chromatogramm einer aufgearbeiteten Urinprobe, zu der je 250 mg/l Mandelsäure bzw. Phenylglyoxilsäure addiert wurden, ist in Abbildung 4 dargestellt. In diesem Falle er-

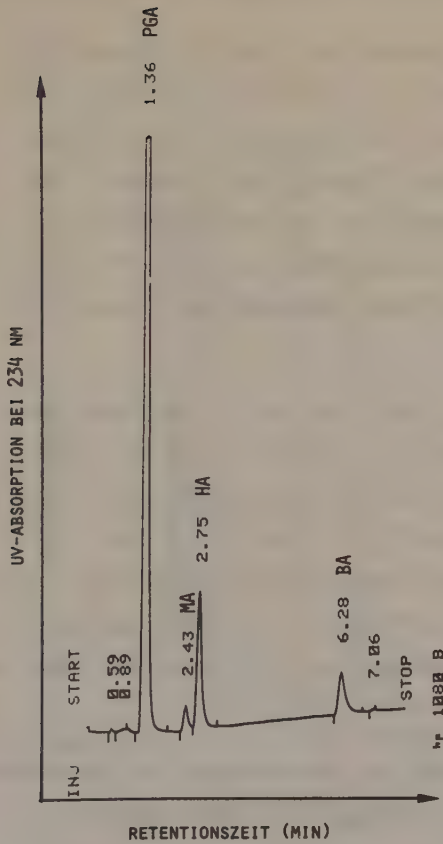


Abbildung 31: Chromatogramm einer Standard-Lösung von
Phenylglyoxil- (PGA), Mandel- (MA), Hippur- (HA)
und Benzoesäure (BA)

folgte die Aufarbeitung ohne die Reextraktionsschritte.

Unter identischen chromatographischen Bedingungen (linearer Gradient; Start: 10 % Methanol; in 10 min. nach 90 % Methanol) ließen sich wässrige Standardlösungen von Phenylglyoxilsäure, Mandelsäure, Hippursäure und Benzoesäure gut trennen. Bei den Urinprobenanalysen wurde der Mandelsäurepeak jedoch durch eine Vielzahl von Störpeaks mit gleicher oder ähnlicher Retentionszeit verdeckt.

Fehlermöglichkeiten, welche bei den beschriebenen Verfahren auftreten könnten, haben wir durch die Zugabe von Phthalsäure als internen Standard eliminiert. So entsprachen die Werte für die Präzision in der Serie den allgemeinen Normen und die analytischen Zuverlässigkeitskriterien des Verfahrens den Anforderungen der statistischen Qualitätskontrolle in klinisch-chemischen Laboratorien.

Die Abbildung 32 zeigt das Chromatogramm der aufgearbeiteten Urinprobe eines Styrol-exponierten Arbeiters.

Die Zuverlässigkeitskriterien der Analysenmethode sind mit denen unseres gaschromatographischen Verfahrens vergleichbar (WILL et al. 1980). Die quantitative Bestimmung von Mandelsäure und Phenylglyoxilsäure aus Urinproben wird ausführlich bei ZSCHIESCHE et al. (1978/

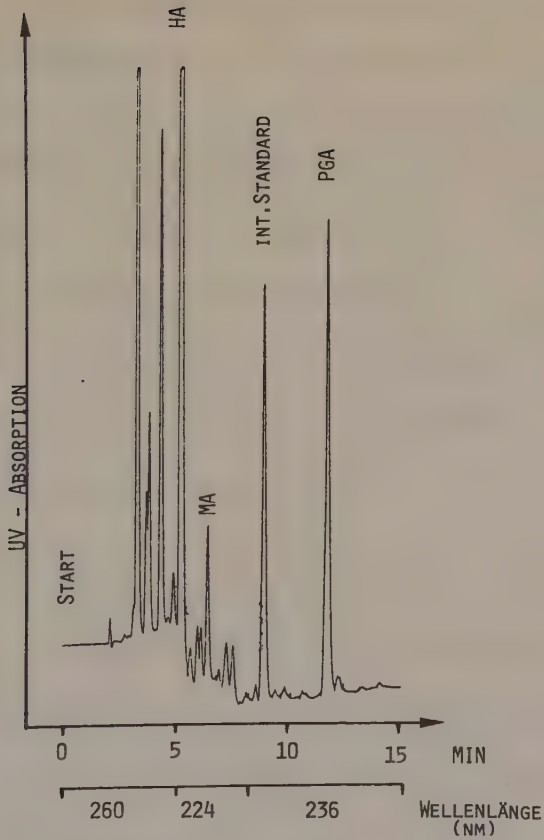


Abbildung 32: Chromatogramm einer Urinprobe einer Styrol-exponierten Person

1979) und bei WILL et al. 1980 beschrieben. Beide Verfahren sind unserer Meinung nach im Hinblick auf Zuverlässigkeit und Praktikabilität als gleichwertig einzustufen.

2.5. Quantitative Bestimmung von p-Aminophenol und Anilin im Urin

2.5.1. Einleitung

Anilin ist eine in der chemischen Großindustrie häufig verwendete Ausgangssubstanz für organische Synthesen, z.B. bei der Herstellung von Farbstoffen (Anilinfarbstoffen), Pharmazeutika und Sulfonamiden, von Isocyanat-Kunststoffen, Kautschukchemikalien (Alterungsschutzmitteln und Vulkanisationsbeschleunigern), Photochemikalien (Hydrochinon) und von Cyclohexylamin. Eine häufige Anwendung findet Anilin auch als Lösungsmittel. Im Laboratorium ist Anilin für die Herstellung von Diazoniumsalzen bedeutsam (RÖMPP 1979).

Anilin und einige seiner Derivate bilden im menschlichen Körper durch metabolische Umwandlung p-Aminophenol und über eine Oxidation des Anilins Phenylhydroxylamin. Ein Kreisprozeß, bei dem die gleiche Giftmenge wiederholt zur Wirkung gelangt, macht diese aromatischen Verbindungen als Blutgifte besonders gefährlich. In einer gekoppelten Reaktion wird Phenylhydroxylamin mit Sauerstoff zu Nitrosobenzol und Hämoglobin zu Hämoglobin (Methämoglobin) oxidiert. Das entstandene Nitrosobenzol kann durch das Ferment Hämoglobulinreduktase wieder zu Phenylhydroxylamin reduziert werden, so daß sich der ganze Vorgang wiederholt. So kann eine bestimmte Menge

an Phenylhydroxylamin mehr als eine äquimolare Menge an Hämoglobin zerstören. Bei der Umwandlung des Hämoglobins zu Hämitoglobin wird das zweiwertige Eisen zu dreiwertigem Eisen oxidiert. Deshalb kann Hämitoglobin keinen Sauerstoff mehr im Blut übertragen und erzeugt daher in den Geweben einen Sauerstoffmangel. Das Metabolisierungsschema von Anilin ist in Abbildung 33 dargestellt.

Weitere wichtige, in der Arbeitswelt vorkommende p-Aminophenol-Bildner sind z.B. p-Anisidin und Nitrobenzol.

Der größte Teil einer aufgenommenen Anilindosis wird innerhalb der folgenden 24-Stunden als p-Aminophenol konjugiert im Harn ausgeschieden. Ebenso wird eine geringe Menge Anilin in konjugierter Form über die Nieren eliminiert.

Der Verdacht einer gefährlichen Exposition mit Anilin ist gegeben, wenn die p-Aminophenol-Ausscheidung 50 mg/l Urin überschreitet (LAUWERYS 1975).

Aus forensisch-toxikologischer bzw. gewerbe-toxikologischer Sicht ist es wichtig, daß vermehrt p-Aminophenol auch nach der Aufnahme von Medikamenten wie z.B. Phenacetin ausgeschieden wird. Phenacetin, das ein Anilin-Derivat ist, wird hauptsächlich zu N-Acetyl-p-Aminophenol

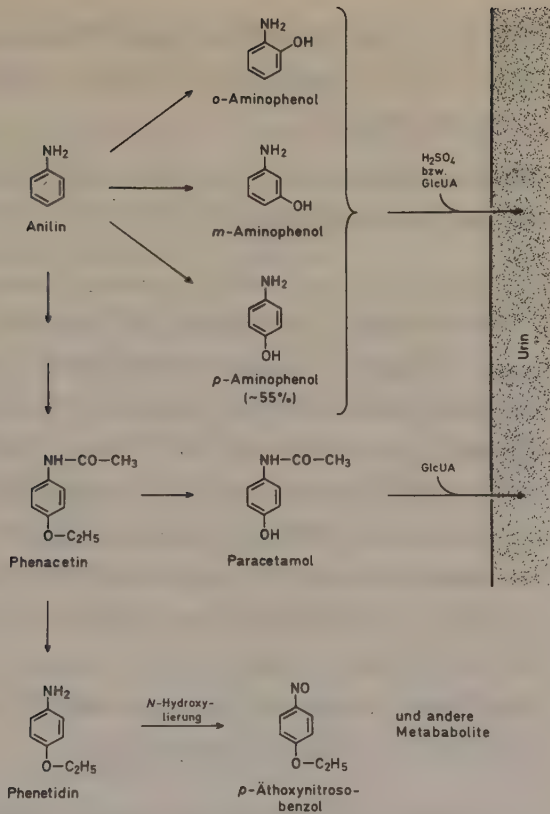


Abbildung 33: Metabolisierungsschema von Anilin
(nach VALENTIN et al. 1979)

desalkyliert. Diese Substanz wird im Körper zu p-Aminophenol oder zu konjugiertem N-Acetyl-p-Aminophenol metabolisiert.

Bei Erkrankungen durch Anilinintoxikation unterscheiden wir zwei Verlaufsformen:

- a) die akute Form zeigt im Anfangsstadium Schwäche, Müdigkeit, Übelkeit, Kopfschmerzen, Schweißausbrüche und Dyspnoe. Zugleich kann eine blaugraue Färbung der Haut auftreten, die anfänglich auf die Extremitäten begrenzt ist, bei schwererer Erkrankung zur Zyanose am ganzen Körper führen kann. Bewußtseinstörung, Erregungszustände, Krämpfe, Kreislaufschwäche und Koma mit eventuellem Tod können die Folge sein von Vergiftungen mit hohen Dosen. In solchen Fällen kommt es ebenfalls zur Schädigung von Erythrozyten mit dadurch bedingter Anämie. Auch eine Schädigung der Leber ist nachgewiesen.
- b) die chronische Form zeigt wiederum das Bild einer Anämie. Hautausschläge und Leberfunktionsstörungen werden beobachtet. Appetitlosigkeit und Magenbeschwerden sind Begleiterscheinungen der Intoxikation. Schwindelgefühl, Schwäche und depressive Stimmungen werden von den Patienten angegeben.

Als Nachweis für die Vergiftung dienen Blutfarbstoff-

und Erythrozytenwerte, die weit unter die Hälfte der Norm absinken. Ikterus und Zyanose sind deutliche Krankheitsbilder. Als Begleitsymptome einer Anilinintoxikation werden bei Störungen des Nervensystems auch neurasthenische Beschwerden aufgeführt (VALENTIN et al. 1979).

p-Aminophenol läßt sich im menschlichen Urin mit einer photometrischen Methode nach GONECHEA (1978) bestimmen. Ein hochdruckflüssigkeitschromatographisches Verfahren wurde unseres Wissens nach bisher noch nicht beschrieben. Um die erhöhte Spezifität chromatographischer Verfahren einzusetzen, erarbeiteten wir eine einfache HPLC-Methode für die gleichzeitige quantitative Bestimmung von Anilin und p-Aminophenol.

2.5.2. Methodik

2.5.2.1. Prinzip des Verfahrens

p-Aminophenol und Anilin werden im Urin teilweise in konjugierter Form ausgeschieden. Vor der Analyse ist deshalb eine Hydrolyse mit Schwefelsäure notwendig. Zur Abtrennung zahlreicher und in einigen Fällen in hohen Konzentrationen vorkommender Verbindungen mit saurem Charakter wird anschließend das p-Aminophenol mit Ethylacetat extrahiert. Für den chromatographischen Nachweis wird die Trennung mit der Reversed Phase-Technik

nik und die Detektion im UV-Bereich bei 300 nm eingesetzt.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Anilin im Probenmaterial kann nach identischer Probenvorbereitung diese Substanz bei 284 nm erfaßt werden.

2.5.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

Detektor: Variabler Wellenlängendetektor Hewlett Packard (HP)

Chemikalien:

Anilin (Merck), frisch destilliert

p-Aminophenol (EGA)

H_2SO_4 p.A. (Merck)

NaOH p.A. (Merck)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.A. (Merck)

Essigsäureethylester p.A. (Merck)

Methanol p.A. (Merck)

Aqua dest.

Eichlösungen:

Je 18 mg Anilin und 18 mg p-Aminophenol werden in 20 ml

Pool-Urin gelöst, so daß man eine Stammlösung mit 900 mg/l erhält. Mit Pool-Urin stellt man aus dieser Stammlösung Verdünnungen von 0; 18; 45; 90; 180; 450 und 900 mg/l her.

2.5.2.3. Probennahme und Probenlagerung

Das Probenmaterial wird bei längeren Versandzeiten mit Salzsäure leicht angesäuert. Bis zur Analyse lassen sich die Urinproben in der Tiefkühltruhe aufbewahren.

2.5.2.4. Arbeitsvorschrift

Hydrolyse

- 1 2 ml Urin
+ 200 µl konz. H_2SO_4
30 min. Inkubation im
siedenden Wasserbad
Abkühlen auf Raumtemperatur

Extraktion

- 2 Auf pH 9,5 mit 6 M NaOH
einstellen
+ 2 ml Essigsäureethylester
10 min. Schütteln
Zentrifugation
Abheben der organischen Phase
und Aufbewahrung bis zur In-
jektion

HPLC

3

Wellenlängen:

300 nm für p-Aminophenol

284 nm für Anilin

Säulenfüllmaterial: Li-Chrosorb

RP 18 (HP-Fertigsäule)

Trennprinzip: Reversed Phase

Teilchengröße: 5 μm

Säulenlänge: 250 mm

Innerer Durchmesser: 4,6 mm

Säulentemperatur: 40 $^{\circ}\text{C}$

Druck: 128 bar

Flußrate: 1 ml/min.

Probenvolumen: 10 μl

Mobile Phase: H_2O und CH_3OH

Funktion: Linearer Gradient

Start: 10 % CH_3OH

10 min.: 90 % CH_3OH

Quantitative Auswertung

4

2.5.2.5. Eichung

Die Eichkurve ist im untersuchten Bereich von 0 bis 900 $\mu\text{g/l}$ linear (Abb. 34). Normalurin enthält weder Anilin noch p-Aminophenol und muß deshalb bei der Erstellung der Eichkurve nicht berücksichtigt werden.

2.5.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Unter den gewählten Arbeitsbedingungen wurden sowohl für Anilin als auch für p-Aminophenol Nachweisgrenzen von

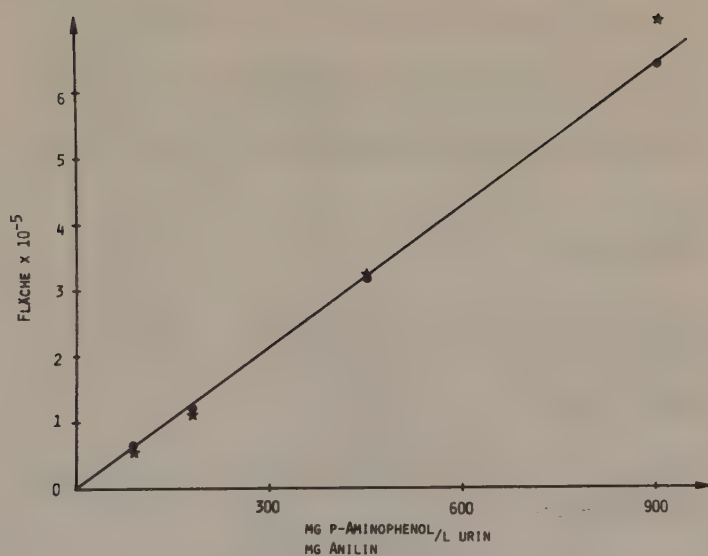


Abbildung 34: Eichkurve für Anilin (•) und p-Aminophenol (*) im Urin
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph:
Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

15 mg/l Urin erzielt.

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie führten wir eine 10-fach-Analyse einer Urinprobe durch. Es handelte sich um den Morgenurin einer Person, die am Abend vorher N-Acetyl-p-Aminophenol eingenommen hat. Zusätzlich haben wir die Probe mit Anilin versetzt. Es ergaben sich folgende Variationskoeffizienten in der Serie:

Anilin: 1,6 %

p-Aminophenol: 3,8 %

Die Richtigkeit der Methode testeten wir durch Wiederauffindungsversuche. Folgende Wiederauffindungsraten wurden erzielt:

Anilin: 97 %

p-Aminophenol: 87 %

Zur Praktikabilität der Methode kann gesagt werden, daß von einer Person pro Tag circa 60 Analysen durchgeführt werden können. Das aufgearbeitete Untersuchungsmaterial wird in einem Rhythmus von 20 Minuten in den Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen injiziert.

2.5.3. Diskussion

Ein Beispiel für eine chromatographische Bestimmung von p-Aminophenol ist in Abbildung 35 gegeben. Der p-Amino-

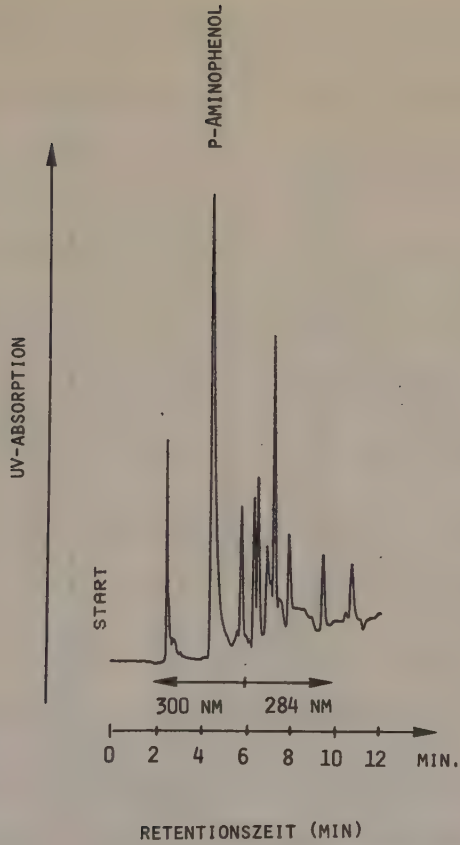


Abbildung 35: Chromatogramm der aufgearbeiteten Urinprobe eines Anilin-exponierten Arbeiters

phenol-Peak aus dem Urin eines Anilin-exponierten Arbeiters ist gut von Substanzpeaks aus der biologischen Matrix abgetrennt. Zur Erzielung geeigneter Chromatogramme ist der Extraktionsschritt mit Essigsäureethylester unbedingt notwendig.

In den Chromatogrammen Anilin-exponierter Arbeiter ist der Anilinpeak selbst nicht vorhanden. Dies deckt sich mit der Tatsache, daß der größte Teil einer aufgenommenen Anilindosis innerhalb der folgenden 24 Stunden als p-Aminophenol konjugiert im Harn ausgeschieden wird (WILLIAMS 1959). Uns ist aus der Literatur nur ein Fall bekannt, wo Anilin direkt im Urin nachgewiesen werden konnte. KNORR und PALMIE (1968) fanden bei einem 13-jährigen Jungen, der 17 g Anilin einnahm, im Urin am ersten Tag nach der Vergiftung 470 µg Anilin/ml Harn. Am zweiten Tag waren es nur noch 4 bis 5 µg und am dritten Tag war kein Anilin analytisch nachweisbar. Anilin wird demnach vom menschlichen Organismus relativ schnell metabolisiert. Als Ausscheidungsprodukt kommt in erster Linie konjugiertes N-Acetyl-p-Aminophenol vor (BRODIE und AXELROD 1948, DIMROTH 1955, KNORR und PALMIE 1968).

Im Chromatogramm von Abbildung 36 ist die aufgearbeitete Urinprobe eines Probanden nach der Aufnahme von N-Acetyl-p-Aminophenol zu sehen. Neben dem p-Aminophenolpeak

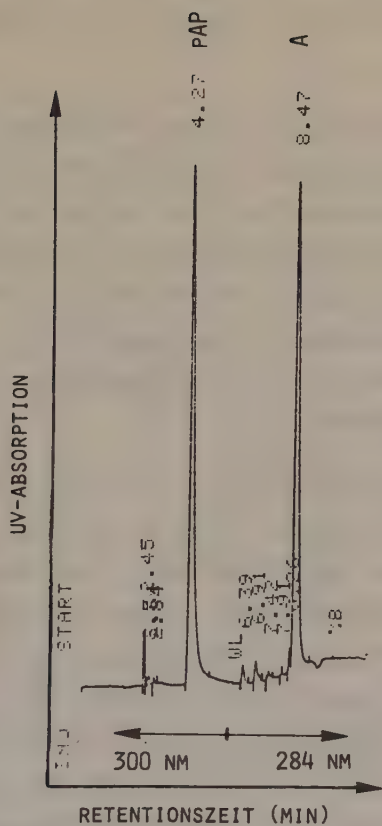


Abbildung 36: Chromatogramm der aufgearbeiteten Urinprobe eines Probanden nach Einnahme von N-Acetyl-p-Aminophenol. Anilin wurde der Urinprobe vor der Aufarbeitung zugesetzt. Anilin (A); p-Aminophenol (pAP).

ist auch der Anilinpeak enthalten. Es handelt sich hierbei um die Harnprobe vor der Aufarbeitung exogen zugesetztes Anilin.

Mit dem hier vorgestellten hochdruckflüssigkeitschromatographischen Verfahren lassen sich Anilin und p-Aminophenol einfach und spezifisch im Harn bestimmen. Für eine weitere Abstützung der Spezifität des Verfahrens haben wir von p-Aminophenol- und Anilin-Peaks die UV-Spektren aufgenommen. In Abbildung 37 ist der Scan eines p-Aminophenolpeak, in Abbildung 38 der Scan eines Anilinpeak abgebildet.

Hinsichtlich der Spezifität ist die HPLC-Methode den normalerweise verwendeten Verfahren überlegen (GONECHEA und GELDMACHER v. MALLINCKRODT 1976). Nach DUBACH (1967) können im Harn ausgeschiedene endogene aromatische Amine beim photometrischen Verfahren zu einer schwachen Blaufärbung und hiermit zu Störungen führen. p-Aminophenol findet sich normalerweise nicht im menschlichen Harn. In arbeitsmedizinischen Bereichen muß jedoch berücksichtigt werden, daß ein positives Analyseergebnis sich auch bei der Einnahme von Medikamenten (z.B. Schmerzmitteln), die Phenacetin oder verwandte Verbindungen enthalten, ergibt.

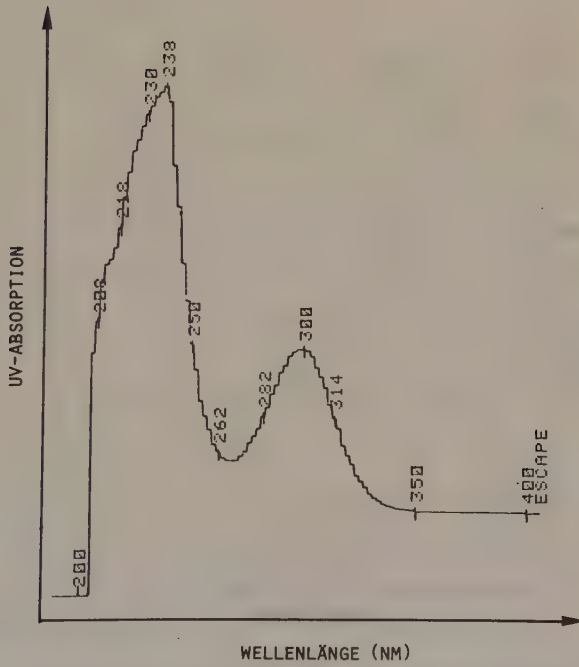


Abbildung 37: Scan eines p-Aminophenolpeak

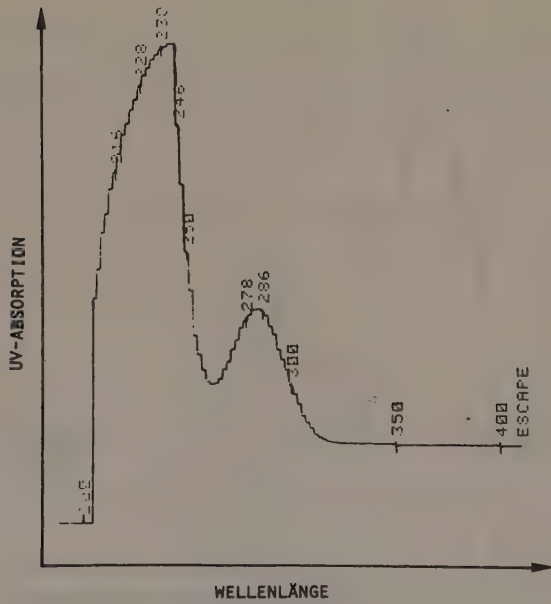


Abbildung 38: Scan eines Anilinpeaks

2.6. Quantitative Bestimmung von 4,4'-Methylen-bis-(2-Chloranilin)(MOCA^R) im Urin

2.6.1. Einleitung

4,4'-Methylen-bis-(2-Chloranilin)(MOCA^R) ist ein bifunktionelles aromatisches Amin. Es wird seit etwa 30 Jahren als Vulkanisationsagens für Epoxide, in der Gummiindustrie und als Zwischenprodukt bei der Herstellung von Polyurethan-Kunststoffen zunehmend verwendet. Nach RAPPAPORT und MORALES (1979) waren 1972 weltweit in den Industrieländern circa 10 000 Personen im Rahmen der Herstellung und Verarbeitung beruflich exponiert. Die Weltproduktion betrug ungefähr 3 300 Tonnen.

Aus arbeitsmedizinisch-toxikologischer Sicht sind aromatische Nitro- und Aminoverbindungen seit vielen Jahren relevant. Sie stellen zum Teil starke Blutgifte (Methämoglobinbildner) dar. Durch die Aufnahme von "Erkrankungen durch Nitro- oder Aminoverbindungen des Benzols oder seinen Homologen oder deren Abkömmlinge" gemäß BK-Nummer 1304 in die gültige Berufskrankheitenliste ist dieser Tatsache seit langem Rechnung getragen worden. Daneben hat REHN bereits 1895 über das vermehrte Auftreten von Blasengeschwülsten bei Arbeitern einer Farbstofffabrik, die beruflich gegenüber aromatischen Aminoverbindungen exponiert waren, berichtet.

Auch in neueren Arbeiten von ZAVON et al. (1973), STASIK (1979) und FOA (1980) wird auf die kanzerogene Potenz der genannten Verbindungsgruppe, sowie das gehäufte Vorkommen von Krebserkrankungen insbesondere im Bereich der ableitenden Harnwege, hingewiesen. Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse führten zur Aufnahme von "Schleimhautveränderungen, Krebs oder anderen Neubildungen der Harnwege durch aromatische Amine" gemäß BK-Nummer 1301 in die gültige BK-Liste.

Der UVB 1982 weist bezüglich der beiden genannten Berufskrankheiten für die Jahre 1980/1981 folgende Zahlen aus:

		angezeigt	entschädigt
BK-Nr. 1301	1980	42	16
	1981	60	23
BK-Nr. 1304	1980	73	0
	1981	66	0

Zur Pharmakologie und Toxikologie von MOCA^R liegen bisher nach unserer Kenntnis keine systematischen Untersuchungen vor. MASTROMATTEO (1965) beschrieb nach inhalativer Exposition gegenüber MOCA^R in der Gummiindustrie Blutungen im Bereich der ableitenden Harnwege. Der eindeutige Kausalzusammenhang wurde jedoch von LINCH et al. (1971) bezweifelt. Eingehende klini-

sche und zytologische Untersuchungen ergaben bei 31 Arbeitern, die zwischen 6 Monaten und 16 Jahren beruflich belastet waren, keine Krebsmanifestationen, obwohl eine unterschiedliche berufliche Exposition anhand von Harnanalysen nachgewiesen werden konnte. Dagegen erbrachten tierexperimentelle Untersuchungen, die von GRUNDMANN und STEINHOFF (1969, 1970, 1971), STULA et al. (1971, 1975) sowie RUSSFIELD et al. (1975) durchgeführt wurden, zweifelsfrei Hinweise für eine kanzerogene Potenz der genannten Substanz nach oraler Verabreichung bei Ratten und Mäusen. Pathomorphologisch standen meist Karzinome der Lunge, der Leber und der Blase im Vordergrund. Außerdem fanden sich Hepatome, Lymphosarkome, Uterussarkome, Hämangiosarkome und Hirntumoren. Dieser wissenschaftliche Erkenntnisstand machte 1978 die Aufnahme von MOCA^R in die Gruppe III A 2 (bislang nur im Tierversuch eindeutig kanzerogen) der MAK-Werte-Liste erforderlich.

Bei dieser Sachlage ergibt sich die Notwendigkeit adäquater arbeitshygienischer Maßnahmen. Die medizinische Vorsorge hat sich dabei am Berufsgenossenschaftlichen Grundsatz G 33 "Aromatische Nitro- und Aminoverbindungen" zu orientieren. Neben einer Erstuntersuchung und der Angabe einer Kontraindikationsliste über gesundheitliche Bedenken für eine Beschäftigung an belasteten Arbeitsplätzen werden auch entsprechende

Oberwachungs- und nachgehende Untersuchungen gefordert.

Die allgemeine Untersuchung umfaßt neben Anamnese und Urinstatus als spezielle Erhebungen Blutstatus, Transaminasen und eventuell γ -Glutamyltranspeptidase. Um genetisch determinierte Enzymdefekte, die eine besondere Empfindlichkeit gegenüber aromatischen Nitro- und Aminoverbindungen bedingen, erkennen zu können, ist die Bestimmung der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase erwünscht. Diese Laboruntersuchungen bereiten in aller Regel heute keine wesentlichen Schwierigkeiten und gehören vielfach zum Routineprogramm. Bisherige Erfahrungen und Erkenntnisse (LINCH et al. 1971, ROOSMALEN et al. 1979) lassen jedoch insbesondere die direkte quantitative Bestimmung von MOCA^R aus dem Urin als geeigneten Parameter zur Objektivierung der beruflichen Belastung erscheinen. Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, arbeitsmedizinisch-toxikologisch ausgerichteten Laboratorien eine praktikable und zuverlässige Methode vorzuschlagen, um Belastungen von Arbeitern in entsprechenden Industriezweigen frühzeitig objektivieren und quantifizieren zu können.

2.6.2. Methodik

2.6.2.1. Prinzip des Verfahrens

Das hier beschriebene Verfahren wurde von WILL et al. (1981) publiziert.

MOCA^R wird säulenchromatographisch im Alkalischen aus dem Urin abgetrennt und angereichert. Hierfür kommen vorgefertigte, kommerziell erhältliche EXTRELUT^R-Säulen zur Anwendung. Diese gestatten es, eine herkömmliche Flüssig-Flüssig-Extraktion durch eine Säulenchromatographie zu ersetzen. MOCA^R wird mit Dichlormethan/Isoopropanol desorbiert und anschließend hochdruckflüssigkeitschromatographisch mit der Reversed Phase-Technik bestimmt. Die UV-Detektion erfolgt im Absorptionsmaximum bei 248 nm. Für die Eichung wird Normalurin mit definierten Mengen an MOCA^R analog aufgearbeitet.

2.6.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

Detektor: Variabler Wellenlängendetektor: Hewlett Packard (HP).

Chemikalien:

4,4'-Methylen-bis-(2-Chloranilin)

Extrelut^R-Fertigsäulen (Merck)

NH₄Cl/NH₃-Puffer pH 9,5 (kaltgesättigte, wässrige
NH₄Cl-Lösung, mit 25 % Ammoniaklösung auf pH 9,5 ein-
stellen).

NaOH, p.A. (Merck)

Dichlormethan, p.A. (Merck)

Isopropanol, p.A. (Merck)

Methanol, p.A. (Merck)

Acetonitril, p.A. (Merck)

Aqua dest.

Standardlösungen:

Standards:

10 mg MOCA^R werden in 10 ml Methanol gelöst. 20 µl die-
ser Lösung gibt man zu 100 ml Pool-Urin. Aus dieser
Lösung werden mit Pool-Urin Verdünnungen hergestellt,
die 0; 20; 50; 100 und 200 µg MOCA^R/l Urin enthalten.

2.6.2.3. Probennahme und Probenlagerung

Die Urinproben werden ohne Zusätze bis zur Analyse
kurzfristig im Kühlschrank bei +4 °C und längerfri-
stig im Tiefkühlschrank gelagert.

2.6.2.4. Arbeitsvorschrift

Probenvorbereitung

Extraktion

1

1 ml $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -Puffer zu 20 ml
Urin bzw. Standardlösungen hin-
zufügen
mit 6 M NaOH auf pH 9,5 einstellen
diesen Ansatz auf die Extrelut^R-
Fertigsäule bringen und die Flüs-
sigkeit einziehen lassen
mit 50 ml Dichlormethan/Isopropanol
(85/14; v/v) extrahieren
Eindampfen der organischen Phase
am Rotationsverdampfer
Lösen des Rückstandes in 1 ml
 CH_3OH

HPLC

2

Wellenlänge: 248 nm
Säulenfüllmaterial: Li-Chrosorb^R
RP 18 (HP-
Fertigsäule)
Prinzip der Trennung: Reversed Phase
Korngröße: 10 μm
Säulenlänge: 250 mm
Innerer Durchmesser: 4,6 mm
Säulentemperatur: 40 °C
Druck: 247 bar
Fluß: 4 ml/min.
Probenvolumen: 20 μl
Mobile Phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$; 40/60
(v/v)
Funktion: isokratisch

Quantitative
Auswertung

3

2.6.2.5. Eichung

Die Standards werden auf Urinbasis erstellt und analog den Urinproben aufgearbeitet. In Normalurinproben kann kein MOCA^R nachgewiesen werden.

Die Eichgeraden müssen deshalb durch den Nullpunkt gehen. Im Bereich von 0 bis 200 µg MOCA^R/l Urin ist die Eichkurve linear (Abb. 39)

2.6.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Die Nachweisgrenze des vorgestellten Verfahrens beträgt 15 µg/l. Die Präzision in der Serie wird durch eine Achtfach-Analyse eines Urins mit einem Zusatz von 200 µg MOCA^R/l erhalten. Es errechnet sich ein Variationskoeffizient von 11 %. Wiederauffindungssuche mit den Extrelut^R-Säulen ergeben eine durchschnittliche Rate von 99 %. Mit der Methode lassen sich 25 Analysen pro Tag und Laborkraft durchführen.

2.6.3. Diskussion

Nach unseren Kenntnissen sind bis jetzt in der Literatur zur Bestimmung von MOCA^R im Urin nur gaschromatographische Methoden eingesetzt worden (LINCH et al. 1971, VAN ROOSMALEN 1979). Diese Methoden erfordern

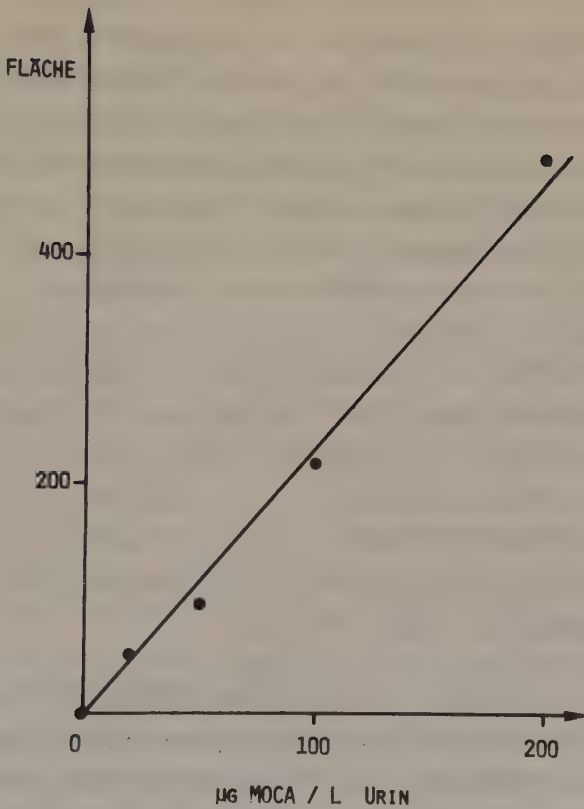


Abbildung 39: Eichkurve für MOCA^{R} im Urin

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph:

Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

durchweg eine umfangreiche Probenvorbereitung. MOCA^R wird aus dem Urin extrahiert und anschließend durch mehrmaliges Auswaschen von störenden Bestandteilen abgetrennt. Nach einer Derivatisierung mit Trifluoressigsäure-Anhydrid erfolgt die gaschromatographische Trennung und die quantitative Erfassung am ECD (Electron Capture Detector). Bei der von LINCH et al. (1971) beschriebenen Methode werden Interferenzen beobachtet. ROOSMALEN et al. (1979) haben deshalb zusätzlich für die Probenvorbereitung einen dünnschichtchromatographischen Arbeitsschritt eingebaut. Neben der Verbesserung der Richtigkeit kann zusätzlich eine günstigere Nachweisgrenze erzielt werden. Dieser Arbeitsgruppe ist es möglich, bis zu 1 µg MOCA^R/l Urin nachzuweisen, während LINCH et al. (1971) eine Nachweisgrenze von 40 µg/l Urin angeben.

Mit der hier beschriebenen Methode können circa 15 µg MOCA^R/l Urin quantitativ erfaßt werden. Den entscheidenden Vorteil der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Bestimmung sehen wir in der einfachen Probenvorbereitung. Durch die säulenchromatographische Abtrennung des MOCA^R von der Urin-Matrix und anschließender Endpunktbestimmung mit der HPLC gestaltet sich das Verfahren wesentlich einfacher. Die Praktikabilität der Methode wird weiterhin durch die Verwendung vorgefertigter, kommerziell erhältlicher Chromatographie-

Säulen erhöht.

Versuche zur Optimierung der HPLC-Bedingungen zeigen, daß Methanol/Wasser-Gemische als mobile Phase eine Trennung des MOCA^R von den übrigen Urinbestandteilen nicht oder nur unzureichend ermöglichen. Erst durch den Einsatz von Acetonitril/Wasser (40/60; v/v) konnte die Säulentrennleistung in zufriedenstellender Weise verbessert werden.

Das vorgestellte Verfahren wurde von uns im praktischen Einsatz getestet. Zum einen untersuchten wir 20 Normalurinproben. In keiner dieser Urinproben konnte MOCA^R oder ein störender Peak nachgewiesen werden (Abb. 40). Zum anderen wurden 49 Spontanurinproben von MOCA^R-exponierten Personen aus einer kunststoffherstellenden und -verarbeitenden Fabrik analysiert. Die Höhe der externen Exposition, dokumentiert durch den MOCA^R-Gehalt der Raumluft, war nicht bekannt. Die erhaltenen Fremdstoffkonzentrationen lagen im Bereich von 15 µg/l bis circa 100 µg/l. Bei den Höchstkonzentrationen wurde die Identität des MOCA^R-Peaks durch ein Stop-Flow-Verfahren UV-spektrometrisch nachgewiesen.

Unsere Studien zeigen, daß das hier vorgestellte Analysenverfahren für ein "Biological Monitoring" von MOCA^R-exponierten Personen in der Routine einsetzbar ist.

METHYLEN - BIS - (2-CHLORANILIN) , MOCA[®]

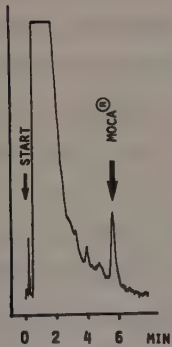
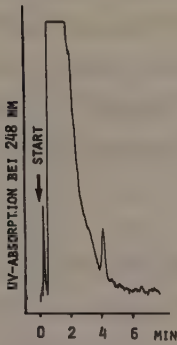
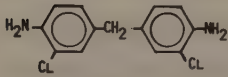


Abbildung 40: Chromatogramm eines aufgearbeiteten Normalurins (oben) und einer Urinprobe eines gegenüber MOCA^R exponierten Arbeiters (unten)

2.7. Bestimmung von Copro- und Uroporphyrin im Urin

2.7.1. Einleitung

Die quantitative Bestimmung der renalen Porphyrinausscheidung ist in der Medizin für die Diagnostik und Prävention verschiedener Krankheiten von Bedeutung. So ist die fraktionierte Erfassung der Porphyrine zur Differentialdiagnose der Porphyrinurie und der verschiedenen Formen der hepatischen Porphyrie von Wichtigkeit (DOSS und MEINHOF 1971, ELDER et al. 1972). Unter den Coproporphyrien sind neben der seltenen dominant vererbten und der hereditären hepatischen Coproporphyrinurie die toxisch bedingten und die sekundären Coproporphyrien am häufigsten (MOLITOR 1982). Als Auslöser der toxischen Coproporphyrien sind insbesondere Blei und seine Verbindungen, aber auch Barbiturate, Sulfonamide, allylsubstituierte Pharmaka usw. bekannt.

Unter den bisher beobachteten Schäden durch anorganische Bleiverbindungen sind von großer praktischer arbeitsmedizinischer Bedeutung die Störungen des hämatopoetischen Systems (Abb. 41). Als besonders empfindliche Zeichen der Bleiexposition sind folgende Störungen der Porphyrinsynthese bekannt:

- die Hemmung der Delta-Aminolaevulinsäure-Dehydratase der Erythrozyten (ALA-D),

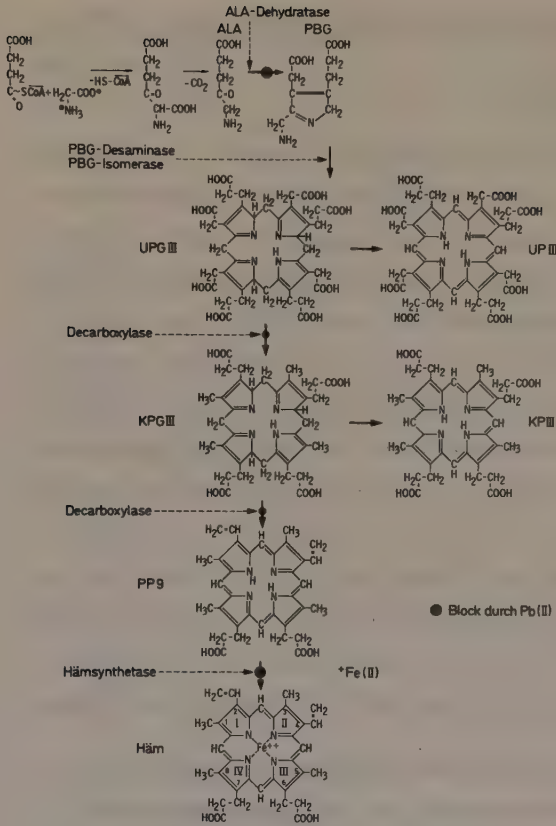


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Störungen des hämatopoetischen Systems bei Bleiintoxikation (nach VALENTIN et al. 1979)

- die Vermehrung der Erythrozytenporphyrine (EP) sowie
- die Erhöhung der Ausscheidung der Delta-Aminolävulininsäure im Urin (ALA-U) und des Coproporphyrins III (CP-U).

Diese Störungen sind wesentlicher Bestandteil der Symptomatologie einer Bleiintoxikation. Aufgrund der pathogenetischen Mechanismen kann mit einer vermehrten Ausscheidung von Porphyrinkörpern schon in frühen Stadien der Vergiftung gerechnet werden.

Nach Angaben von SCHERMULY und DOSS 1975 werden bei Bleivergiftungen 95 % der Coproporphyrine in Form des Isomeren III ausgeschieden. Ein Anstieg der Coproporphyrin-Konzentration im Urin wird ab Blutbleispiegel von 40 µg/100 ml beobachtet (TOLA et al. 1973). Oberhalb dieses Wertes ist der Coproporphyrinspiegel im Urin der Blutbleikonzentration proportional.

Der diagnostische Wert des Coproporphyrinnachweises im Harn für die Überwachung bleiexponierter Personen wird durch einige Faktoren eingeschränkt. SCHIELE und SCHALLER 1978 haben für die CP-U-Bestimmung folgende Vorteile und Nachteile angegeben:

Vorteile

Geringer methodischer Aufwand

Urinuntersuchung

Keine Kontaminationsgefahr

Nachteile

Kein standardisiertes Verfahren

Geringe Empfindlichkeit

a) im Einzelfall

b) im niedrigen Expositionsbereich

Geringe Spezifität

Instabilität

Intraindividuelle Unterschiede in der Ausscheidung.

Als besonders nachteilig erweist sich, daß eine erhöhte Exkretion von Coproporphyrinen nicht pathognomisch für eine Bleivergiftung ist und die Instabilität der Verbindung.

Der "normale Coproporphyrinspiegel" im Urin liegt unterhalb von 100 µg/l (LAUWERYS 1975). Die in der Literatur angegebenen Porphyrinspiegel bei Normalpersonen unterliegen sehr großen Schwankungen. Sie sind in erster Linie methodisch bedingt, da viele Verfahren nicht genügend untersucht und ihre Fehlerquellen nicht bekannt sind.

Die im folgenden beschriebene hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode ermöglicht eine analytisch zuverlässige und praktikable Bestimmung des Copro- und des Uroporphyrins im Harn.

2.7.2. Methodik

2.7.2.1. Prinzip des Verfahrens

Zur Probenaufbereitung erfolgt eine Adsorption der Urinporphyrine an Talkum. Da die freien Säuren chromatographisch nicht gut zu trennen sind, wird eine Veresterung zu den Methylestern mit einem Methanol/Schwefelsäure-Gemisch vorgenommen. Die wichtigsten Urinporphyrine Coproporphyrin und Uroporphyrin werden dann hochdruckflüssigkeitschromatographisch auf Kieselgelsäulen nach dem Adsorptionsprinzip mit einer mobilen Phase aus Dichlormethan/Essigsäureethylester getrennt. Für die Detektion wird ein Fluoreszenzdetektor verwendet.

2.7.2.2. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph: Hewlett Packard (HP), Modell 1084 B

Detektor: Schoeffel Spektralfluorometer FS 970

Gefriertrocknungsapparatur Heraeus Christ

Chemikalien:

Natriumhydrogencarbonat p.A. (Merck)

konzentrierte Schwefelsäure p.A. (Merck)

Methanol absolut p.A. (Merck)

Talkumpulver

Chloroform p.A. (Merck)

Dichlormethan p.A. (Merck)

Eisessig p.A. (Merck)

Coproporphyrin-I-Ester (Sigma)

Uroporphyrin-I-Ester (Sigma)

Lösungen:

Gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung

$\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_3\text{OH}$ -Lösung (5/95; v/v)

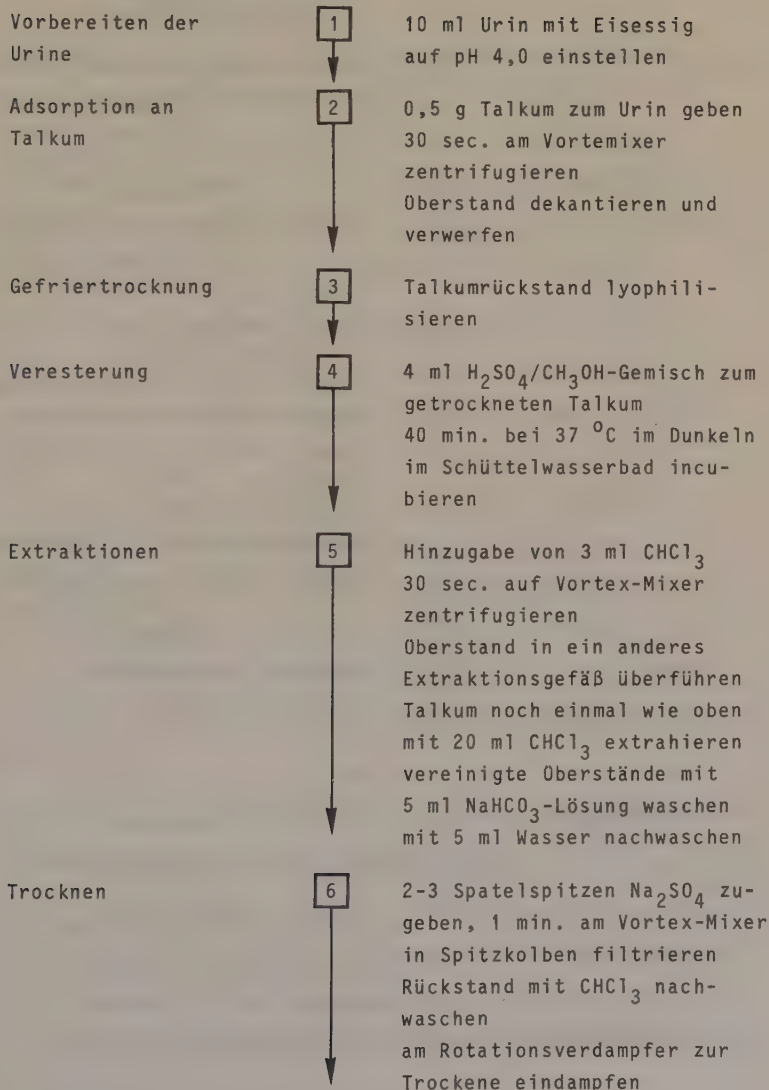
Stammlösung:

2,5 mg von jedem Porphyrin werden in 1 l 1,5 M Salzsäure gelöst. Mit Poolurin stellt man dann Eichverdünnungen von 25 µg Porphyrin/l bis 500 µg Porphyrin/l her.

2.7.2.3. Probennahme und Probenlagerung

Porphyrine sind stark lichtempfindliche Substanzen. Die gewonnenen Urinproben sollten demnach im Dunkeln gelagert werden. Für kürzere Aufbewahrungszeiten eignet sich der Kühlschrank bei + 4 °C. Eine längere Lagerung ist in der Tiefkühltruhe bei - 20 °C vorzunehmen.

2.7.2.4. Arbeitsvorschrift



Vorbereitung zur HPLC

7

mit 2 ml CHCl_3 wieder aufnehmen
in Gläschen abfüllen

HPLC

8

Wellenlängen: Anregung: 402 nm
Emission: Kantenfilter KV 550
entsprechend ca. 620 nm
Trennsäule: Li-Chrosorb Si-100
(HP-Fertigsäule)
Trennprinzip: Adsorption
Teilchengröße: 10 μm
Säulenlänge: 250 mm
Inn. Säulendurchmesser: 4,6 mm
Säulentemperatur: 40 $^{\circ}\text{C}$
Druck: 78 bar
Durchfluß: 4 ml/min
Probenmenge: 10-15 μl
Probenlösemittel: Dichlormethan
Mobile Phase: Dichlormethan/
Essigsäureethyl-
ester (75/25; v/v)
Funktion: isokratisch

Quantitative Auswertung

9

2.7.2.5. Eichung

Die quantitative Auswertung der Analysen erfolgt über Eichkurven. Zu ihrer Erstellung werden verschiedene Standardlösungen mit Poolurin angesetzt. Bei der Ermittlung der Werte ist zu beobachten, daß der Poolurin einen Normalgehalt an Copro- und Uroporphyrin besitzt.

2.7.2.6. Analytische Zuverlässigkeitskriterien der Methode

Die Präzision in der Serie, ausgedrückt als Pearson'scher Variabilitätskoeffizient, betrug bei der 8-fachen Analyse eines Normalurins 7 %. Die Richtigkeit wurde durch Wiederauffindungsversuche getestet. Die Wiederauffindungsraten errechneten sich für das Coproporphyrin zu 94 %, für das Uroporphyrin zu 109 %.

Die Analysenergebnisse einiger ausgewählter Urinproben, erstellt mit spektrophotometrischen Methoden, zeigten keine Korrelation mit den Ergebnissen der HPLC-Methode. Dies besonders dann, wenn beide Porphyrine in hohen Konzentrationen vorlagen. Eine Ursache hierfür kann eine reziproke, unspezifische Überlagerung der spektrophotometrischen Meßergebnisse sein. In Bezug auf Spezifität ist das hier beschriebene HPLC-Verfahren den üblichen spektrophotometrischen Verfahren ohne vorhergehende chromatographische Trennung überlegen.

Unter den angegebenen Probenaufarbeitungsbedingungen werden folgende Nachweisgrenzen erzielt:

Coproporphyrin: 2 µg/l

Uroporphyrin : 4 µg/l

Diese Nachweisgrenzen sind für die quantitative Analyse

im Normalbereich vollkommen ausreichend.

Die Praktikabilität der Methode wird hauptsächlich durch den Veresterungsschritt bei der Probenvorbereitung beeinflusst. Aufgrund unserer Erfahrungen kann eine Person pro Tag circa 30 Analysen ausführen.

2.7.3. Diskussion

Für die analytische Bestimmung von Porphyrinen wurden bisher meist photometrische Methoden angewandt (SCHALLER 1978). Setzt man sich kritisch mit diesen Analyseverfahren auseinander, so zeigt sich, daß sie den heutigen Anforderungen hinsichtlich Spezifität und Nachweisgrenzen nicht mehr gerecht werden.

Im Gegensatz zu den photometrischen Methoden lieferten dünnschichtchromatographische Trennungen der Porphyrine zuverlässige Ergebnisse (DOSS 1971). Diese Verfahren sind jedoch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Einige Verbesserungen brachte die Anwendung der HPTLC (high performance thin layer chromatography). Für die quantitative Auswertung der Platten sind jedoch aufwendige Dünnschicht-Scanner notwendig (SEUBERT et al. 1979, SEUBERT und SEUBERT 1979).

In den letzten Jahren wurde auch die HPLC erfolgreich für die quantitative Bestimmung der Urin-Porphyrine

eingesetzt. Als Detektionssystem verwendete man ausschließlich die Photometrie (EVANS et al. 1976, BATTERSBY et al. 1976, CARLSON und DOLPHIN 1976, PETRYKA und WATSON 1976, SEUBERT und SEUBERT 1978).

Als Probenvorbereitung wurde von diesen Autoren eine Derivatisierung der Porphyrine zu den entsprechenden Methylestern vorgeschlagen. In einigen Fällen erfolgt noch eine zusätzliche Umsetzung zu den Kupfer-II-Chelaten.

Die hier beschriebene Methode erfordert ebenfalls eine Veresterung der Porphyrine. Der zumeist verwendete UV-Detektor wird durch einen Fluoreszenzdetektor ersetzt.

Abbildung 42 zeigt das Chromatogramm der aufgearbeiteten Urinprobe bei fluorimetrischer Detektion der Porphyrine. Durch diese Detektionsart sind Messungen der physiologischen Porphyrinkonzentrationen im Urin möglich. Im Vergleich zur UV-Detektion ist die Empfindlichkeit circa um den Faktor 10 verbessert. Unter den hier angegebenen Arbeitsbedingungen kann bei Einstellung der optimalen Wellenlängen für Anregung und Emission eine absolute Porphyrinmenge von 0,5 ng/Injektion nachgewiesen werden.

ENGLERT et al. (1978) beschreiben eine einfache HPLC-Methode zur Isolierung und Messung von Porphyrinen im

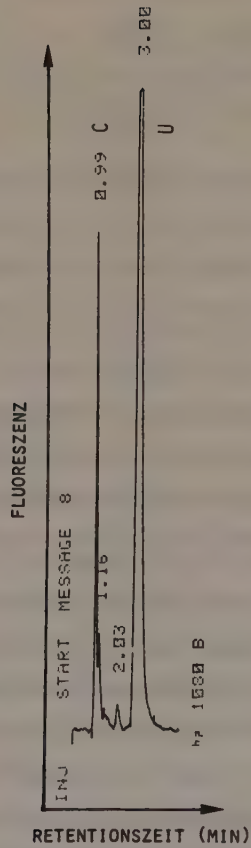


Abbildung 42: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Urinprobe einer Person mit Porphyrinurie.
Coproporphyrin (C), Uroporphyrin (U)

biologischen Material. Als Trennprinzip benutzen sie ebenfalls die Reversed Phase-Chromatographie und zur Detektion ein Spektralfluorimeter. Störende fluoreszierende Substanzen aus der Matrix werden mit einer Vorsäule eliminiert. Aufgrund der großen Unterschiede in der Urin-Matrix mußte die Eichung durch Standardadditionen zu jeder Probe vorgenommen werden. In Vorversuchen testeten wir ebenfalls die Möglichkeit einer chromatographischen Trennung von derivatisierten Porphyrinen. Die hohe Polarität dieser Substanzen erbrachte jedoch große Schwierigkeiten. Neben diesem Problem erweist sich das von ENGLERT et al. (1978) vorgeschlagene Analysenverfahren bei der Eichung als schwierig.

Von der Qualität der analytischen Zuverlässigkeitskriterien hängt es vor allem ab, ob neu entwickelte analytische Methoden akzeptiert werden. Die für das beschriebene Verfahren erarbeiteten Werte sind durchwegs als gut zu bezeichnen. In zweiter Linie müssen bei einem Bestimmungsverfahren die Kriterien der Praktikabilität und der Ökonomie erfüllt sein. Der Einsatz der von uns vorgeschlagenen Methode in der Routineanalytik wird durch die Derivatisierung der Porphyrine mit einem Schwefelsäure/Methanol-Gemisch, durch die vereinfachten Aufarbeitungsschritte und durch die fluorimetrische Detektion ermöglicht.

3. Schlußfolgerungen

In der arbeitsmedizinischen Praxis haben quantitative Untersuchungen biologischen Materials im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen bei beruflich Fremd- oder Schadstoff-exponierten Personen eine zunehmende Bedeutung erlangt. In vielen Berufsgenossenschaftlichen Grundsätzen ist das sogenannte "biological monitoring" erforderlich bzw. erwünscht. Eine sinnvolle und effektive Durchführung dieser Methoden erfordert sowohl zuverlässige und praktikable Analysenmethoden als auch die Existenz von entsprechenden Grenzwerten zur arbeitsmedizinischen Beurteilung. Die letztere Bedingung ist neuerdings durch die Evaluierung von BAT-Werten gewährleistet. Die neue MAK-Wert-Liste 1982 enthält bereits für mehrere arbeitsmedizinisch relevante Substanzen BAT-Werte in Blut, Urin und Atemluft.

Die analytischen Voraussetzungen sind durch die Einbeziehung moderner Methoden der Analytischen Chemie in das arbeitsmedizinisch-toxikologische Laboratorium gegeben. Zur quantitativen Erfassung organischer Schadstoffe bzw. deren Metaboliten stehen photometrische und chromatographische Meßverfahren zur Verfügung. In den letzten Jahren hat auch die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie Eingang in das arbeitsmedizinische La-

boratorium gefunden.

Die hier vorliegende Methodensammlung berücksichtigt die wichtigsten zur Zeit routinemäßig in unserem Institut praktizierten hochdruckflüssigkeitschromatographischen Arbeitsverfahren. Die Methoden haben sich bei unzähligen Routineuntersuchungen in der Praxis bereits seit längerem bewährt. Insbesondere die Universalität der HPLC-Verfahren erwies sich von großem Vorteil.

In den meisten Fällen konnte auf eine aufwendige Probenaufbereitung verzichtet bzw. vorhandene Verfahren wesentlich vereinfacht werden. Die Ursache hierfür liegt vor allem in der Tatsache, daß die HPLC im Gegensatz z.B. zur Gaschromatographie die Analyten im flüssigen Medium - wie sie im biologischen Material vorliegen - erfaßt.

Unsere Methodensammlung beschreibt ausschließlich die quantitative Erfassung UV - bzw. Fluoreszenz - aktiver Substanzen. In der Zukunft wird die Entwicklung neuer Detektionssysteme das Spektrum der zu bestimmenden Stoffe noch wesentlich erweitern. Von Bedeutung dürften hier vor allem die elektrochemischen Detektoren sein. Daneben werden Reaktionsdetektoren entwickelt, die eventuell das breite Feld organischer Farbreaktionen - wie sie bisher in der Dünnschichtchromatographie benutzt wurden - für die HPLC eröffnet. Der Bau Mikro-

prozessor-gesteuerter automatischer HPLC-Apparaturen wird ein Weiteres dazu beitragen, diese Technik für die Routine noch geeigneter zu machen.

Diese Entwicklungen lassen erwarten, daß der Einsatzbereich von HPLC-Verfahren zukünftig noch erweitert und die Spezifität und Praktikabilität der Methoden noch optimiert werden können. Diese Technik wird dann auch ein Beitrag zu einer ökonomisch vertretbaren Analytik in der arbeitsmedizinischen Vorsorge sein.

Obwohl sich neuerdings bereits in klinisch-chemischen Laboratorien HPLC-Geräte für die Routineanalytik finden, muß aber immer noch darauf hingewiesen werden, daß die Anwendung dieser Meßtechnik ausgebildeten Laborpersonals bedarf. Die Einarbeitung in die vielseitig wechselnden Parameter von HPLC-Systemen erfordert Zeit und verlangt ein fundiertes chemisch-physikalisches Grundwissen.

Die vorgestellte Methodensammlung stellt eine Auswahl von Analysenparametern dar, welche keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt. Neben den hier beschriebenen Urinanalysen werden auch andere Untersuchungsmaterialien, insbesondere Blut, Speichel und Liquor, eventuell auch Gewebeprobe auf Fremd- oder Schadstoffe mit dieser Technik untersucht werden können.

4. Literatur

Angerer, J., K.H. Schaller:

Arbeitsmedizin, Sozialmedizin, Präventivmedizin,
11/12, Heft 12/76, S. 311 u. 1/77 S. 33 (1966/76)

Angerer, J.:

Analysen im biologischen Material. Analytische Methoden
zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe.

In: Henschler, D. (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim (1978)

Angerer, J.:

Int.Arch.Occup.Environ.Hlth. 42, 257 (1979)

Angerer, J.:

Int.Arch.Occup.Environ.Hlth. 43, 63 (1979)

Bardodeji, Z.:

Arbeitsmed., Sozialmed., Arbeitshyg. 5, 141 (1968)

Bardodeji, Z., E. Bardodejova:

Amer.Ind.Hyg.Ass. J. 31, 206 (1970)

Battersby, A.R., D.G. Buckley, G.L. Hodgson, R.E. Mark-
well, E. McDonald:

High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry.

In: P.F. Dixon, C.H. Gray, C.K. Lim, M.S. Stoll, eds.

Academic Press, New York, S. 33 (1976)

Breiter, J.:

Kontakte (Merck) 2, 21 (1981)

Brodie, B.B., J. Axelrod:

J.Pharm.Exp.Th. 94, 22 (1948)

Brodie, B.B., J. Axelrod:

J.Pharm.Exp.Th. 97, 58 (1949)

Buchet, J.P., R. Lauwerys, M. Cambier:

Europ.J.Arc.Toxicol. 1, 27 (1972)

Buchet, J.P., R. Lauwerys:

Brit.J.Ind.Med. 30, 125 (1973)

Caperos, J.R., J.G. Fernandez:

Brit.J.Ind.Med. 34, 229 (1977)

Carlson, R.E., D. Dolphin:

High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry.

In: P.F. Dixon, C.H. Gray, C.K. Lim, M.S. Stoll, eds.

Academic Press, New York, S. 87 (1976)

Dimroth, K.:

In: Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Auflage.

Hrsg. von Hoppe-Seyler u. Thierfelder, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen 3/1, 568 (1955)

Dirmkis, S.M., A. Barbre:

J. Chrom, 94, 169 (1974)

Doss, M.:

Anal. Biochem. 39, 7 (1971)

Doss, M., W. Meinhof:

Dtsch.Med.Wschr. 96, 1006 (1976)

Dubach, U.C.:

Dtsch.Med.Wschr. 92, 211 (1967)

Elder, G.H., C.H. Gray, D.C. Nicholson:

J.Clin.Path. 25, 1013 (1972)

Engelhardt, H.:

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York (1975)

Englert, E. Jr., E.E. Wales, A.W. Wayne, R.C. Straight:

Gastroenterology 74, 1031 (1978)

Engström, K., K. Husman, J. Rantanen:

Int.Arch.Occup.Environ.Hlth. 36, 153 (1976)

Evans, M., A.H. Jackson, S.A. Matlin:

J.Chromatogr. 125, 345 (1976)

Friedel, H.P.:

Berufsgenossenschaftliche Grundsätze für arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen - bisherige Ergebnisse und neue Entwicklungen.

Arbeitsmed. Kolloquium d. Hauptverb. d. gewerblichen Berufsgenossenschaften an der Jahrestagung der Dtsch. Gesellschaft f. Arbeitsmed. Berlin 15.05.1981, Gentner Verlag Stuttgart (1981)

Foa, V.:

International Seminar: Assessment of Toxic Agents at the Workplace - Roles of Ambient and Biological Monitoring.

Commission of the European Communities, Luxembourg,
8. - 12. December 1980

Gerarde, H.W.:

Ind.Hyg. and Toxicol. Vol. II, 1226
New York: Interscience (1962)

Goenechea, S., M. Geldmacher v. Mallinckrodt:

Analysen im biologischen Material. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe.

In: Henschler, D. (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim
Band 2 (1978)

Goetz, E., H.H. Rauschelbach:

Anhaltspunkte für die ärztliche Gutachtertätigkeit.
Ausgabe 1973 (Hrsg.: BMAS)
Köllen Druck und Verlag (1973)

Gossler, K., K.H. Schaller, W. Zschiesche:

Clin.Chim.Acta 78, 91 (1977)

Gossler, K., W. Will, K.H. Schaller, W. Zschiesche:

Arbeitsmed., Sozialmed., Präventivmed. 14, 236 (1979)

Gossler, K., W. Will, K.H. Schaller, E. Schnödt:

Fresenius Z. Anal.Chem. 301, 20 (1980)

Gossler, K., G. Triebig, M. Klinger:

Fresenius Z. Anal.Chem. 307, 414 (1981)

Grundmann, E., D. Steinhoff:

Z. Krebsforsch. 74, 28 (1970)

Haften, van A.A., S.T. Sie:

Amer.Ind.Hyg.Assoc.J. 26, 52 (1965)

Hauser, V.A., D. Fuchs, H. Wachter:

J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 19, 375 (1981)

Henkel, E., A. Kokeuge, H. Meier:

Fresenius Z.Anal.Chem. 301, 175 (1980)

Henschler, D. (Hrsg.):

Analysen im biologischen Material. Analytische Methoden
zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe.

Verlag Chemie, Weinheim, Band 2, S. 29 (1978)

Hulpke, H., U. Werthmann, G. Berger:

GIT Fachz.Lab. 25, 559 (1981)

Ikeda, M., J. Ohtsuji:

Brit.J.Ind.Med. 26, 244 (1969)

Ingersoll, A.W., S.H. Babcock:

Org.Synth. II, 328 (1943)

Jaffé, M.:

Z.Physiol.Chem. 10, 391 (1886)

Johnson, L., R. Stevenson:

Basic Liquid Chromatography.

Varian Associates, In. (1978)

Kaiser, R.E., E. Oelrich:

Optimierung in der HPLC.

Dr. Alfred Hüthig Verlag. Heidelberg, Basel, New York
(1979)

Kakac, B.:

Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen.

Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Kira, S.:

Brit.J.Ind.Med. 34, 305 (1977)

Knorr, D., P. Palmie:

Monatsschr. f. Kinderheilkunde 3, 110 (1968)

Kommineni, Ch., D.H. Groth, J. Frockt:

J.Environ.Path.Toxicol. 2, 149 (1979)

Küng, H., M. Larsen:

Arbeitsmed., Sozialmed., Präventivmed. 12, 98 (1977)

Langer, K.:

Persönliche Mitteilung (1980)

Lauwerys, R.:

Scand.J.Work Environ.Hlth. 1, 139 (1975)

Lehnert, G.:

Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte.

Arbeitsmed., Sozialmed., Präventivmed. 15, 266 (1980)

Linch, A.L., G.B. O'Conner, J.R. Barnes, A.S. Kilian,
W.E. Neeld:

Amer.Ind.Hyg.Assoc.J. 32, 802 (1971)

Marx, M.:

Medizinische Begutachtung, Grundlagen und Praxis
(Gutachten-Fibel).

Stuttgart, Thieme Verlag (1981)

Mastromatteo, E.:

J.Occup.Med. 7, 502 (1965)

Matsui, H., M. Kasao, S. Imamura:

Brit.J.Ind.Med. 34, 310 (1977)

Matsui, H., M. Kasao, S. Imamura:

J. of Chromatogr. 145, 231 (1978)

Maximale Arbeitsplatzkonzentration 1981.

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur
Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe.

Mitteilung XVII.

Meyer, V.:

Laborbücher Chemie. Praxis der Hochleistungs-Flüssig-
keits-Chromatographie.

Verlag Diesterweg, Salle und Sauerländer, Frankfurt/M.,
Berlin, München (1979)

Mikulski, P., R. Wiglusz, A. Bublewska, J. Uselis:
Brit.J.Ind.Med. 29, 450 (1972)

Molitor, H.:

Wehrmed.Meschr. 2, 58 (1981)

Ogata, M., K. Tomokuni, Y. Takatsuka:
Brit.J.Ind.Med. 27, 43 (1970)

Ogata, M., Y. Takatsuka, K. Tomokuni:
Brit.J.Ind.Med. 28, 382 (1971)

Ogata, M., R. Sugihara, S. Kira:
Int.Arch.Occup.Environ.Hlth. 39, 199 (1977)

Organikum - Organisch-Chemisches Grundpraktikum.
15. Auflage, S. 672. VEB Deutscher Verlag der Wissen-
schaften, Berlin (1977)

Pagnotto, L.D., L.M. Liebermann:
Amer.Ind.Hyg.Assoc.J. 28, 129 (1967)

Petryka, Z.J., C.J. Watson:
Anal.Biochem. 84, 173 (1978)

Rappaport, S.H., R. Morales:
Anal.Chem. 51, 19 (1979)

Rehn, L.:

Arch.Klin.Chir. 50, 588 (1895)

Riggenmann, H.:

Laborpraxis Juli/August 26 (1981)

Roberts, I.D., M.C. Caserio:

Basic Principles of Organic Chemistry.

W.A. Benjamin, IWC, New York-Amsterdam, S. 912 (1965)

Römpf:

Chemie Lexikon, 8. Auflage.

Franckh'sche Verlagshandlung W. Keller + Co., Stuttgart
(1979)

Roosmalen, van, P.B., J. Drummond:

Brit.J.Ind.Med. 35, 56 (1978)

Roosmalen, van, P.B., A.L. Klein, J. Drummond:

Amer.Ind.Hyg.Assoc.J. 40, 66 (1979)

Russfield, A.B., F. Hamburger, E. Bogner, C.G. Dongen,

E.K. Weisburger, J.H. Weisburger:

Toxicol.Appl.Pharmacol. 31, 47 (1975)

Schaller, K.H.:

Koproporphyrin.

In: Henschler, D. (Hrsg.). Analysen im biologischen Material. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheits-schädlicher Arbeitsstoffe.

Verlag Chemie, Weinheim, Bd. 2, S. D1 (1978)

Schaller, K.H., G. Triebig, H. Valentin:

Hinweise für arbeitsmedizinisch-toxikologische Untersuchungen bei der Einwirkung gesundheitsgefährdender Arbeitsstoffe.

In: Arbeitsmedizin aktuell

Hrsg.: Brenner, W., H.J. Florian, E. Stollenz, H. Valentin
3. Lieferung. G. Fischer Verlag, Stuttgart (1979)

Schaller, K.H., G. Triebig, H.J. Raithel, H. Valentin:

Physikalisch-chemische Analysenmethoden und ihre Bedeutung im Rahmen arbeitsmedizinischer Vorsorgeuntersuchungen.

In: Arbeitsmedizin aktuell

Hrsg.: Brenner, W., H.J. Florian, E. Stollenz, H. Valentin
10. Lieferung. G. Fischer Verlag, Stuttgart (1982)

Schermuly, E., M. Doss:

Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 13, 299 (1975)

Schiele, R., K.H. Schaller:

Therapiewoche 28, 8478 (1978)

Schiele, R.:

Zbl.Arbeitsmed. 28, 1 (1978)

Schönberger, A., Mehrrens, G., Valentin, H.:

Arbeitsunfall und Berufskrankheit.

Erich Schmidt Verlag, Berlin (1981)

Schoofs, T., K. Gossler, K.H. Schaller:

GIT Fachz.Lab. 22, 608 (1978)

Sedivek, V., J. Flek:

Collection Czechoslov.Chem.Comm. 35, 3265 (1970)

Sedivek, V., J. Flek:

Int.Arch.Occup.Environ.Hlth. 37, 205 (1976 a)

Sedivek, V., J. Flek:

Int.Arch.Occup.Environ.Hlth. 37, 219 (1976 b)

Seubert, A., S. Seubert:

3. Dtsch. Diskussionstagung f. Anwender der Hochdruck-
Flüssigkeits-Chromatographie. Königstein/Taunus (1978)

Seubert, A., S. Seubert, H. Ippen:

J.Chromatogr. 41, 1459 (1979)

Seubert, A., S. Seubert:

Dtsch.Med.Wschr. 104, 1459 (1979)

Sherwood, R.J., F.W.G. Carter:

Ann.Occup.Hyg. 13, 125 (1970)

Snyder, L.R., J.J. Kirkland:

Introduction to Modern Liquid Chromatography.

John Wiley & Sons. New York, London, Sydney, Toronto
(1974)

Soldin, S.J., J.H. Hill:

Clin.Chem. 24, 747 (1978)

Stasik, M.J.:

Berichte über das Arbeitsmed. Kolloquium des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften e.V.,
Bonn in Münster/Westf., S. 57 (1979)

Steinhoff, D., E. Grundmann:

Naturwissenschaften 4, 215 (1969)

Steinhoff, D., E. Grundmann:

Naturwissenschaften 11, 578 (1971)

Stula, E.F., H. Schermann, J.A. Zapp, jr.:

Toxicol.Appl.Pharmacol. 19, 380 (1971)

Stula, E.F., H. Schermann, J.A. Zapp, jr., J.W. Clayton, jr.:

Toxicol.Appl.Pharmacol. 31, 159 (1975)

Sugihara, R., M. Ogata:

Int.Arch.Occup.Environ.Hlth. 41, 281 (1978)

Szadkowski, D., A. Jörgensen, H.G. Essing, K.H. Schaller:

Z.klin.Chem.klin.Biochem. 8, 529 (1970)

Szadkowski, D., K.H. Schaller, H.G. Essing, G. Lehnert:

Z.klin.Chem.klin.Biochem. 9, 36 (1971)

Szadkowski, D., R. Pett, J. Angerer, A. Manz, G. Lehnert:

Int. Arch. Arbeitsmed. 31, 265 (1973)

Triebig, G., K. Gossler, M. Klinger:

Fresenius A.Anal.Chem. 299, 271 (1979)

Tola, S., S. Hoernberg, S. Asp, J. Nikkanen:

Brit.J.Ind.Med. 30, 134 (1973)

Unfallverhütungsbericht der Bundesregierung, Deutscher
Bundestag - 9. Wahlperiode, Drucksache 9/2045, 1982

Valentin, H.:

Moderne Vorsorgeuntersuchungen im Arbeitsleben.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedi-
zin, 1968 in Essen

A.W. Gentner Verlag, Stuttgart, S. 33 ff. (1968)

Valentin, H., G. Lehnert, K.H. Schaller, D. Szadkowski,
G. Schäcke, H.G. Essing:

Feindiagnostische Methoden zur Früerkennung bestimmter
beruflich bedingter Gesundheitsschäden.

Erlanger Forschung, Reihe B.: Naturwissenschaften -
Band 6 Junge, Erlangen (1972)

Valentin, H.:

Arbeitsmedizin: Ein kurzgefaßtes Lehrbuch für Ärzte u.
Studenten, Band 2.

G. Thieme Verlag, Stuttgart (1978)

Valentin, H., W. Klosterkötter, G. Lehnert, H. Petry,
J. Rutenfranz, G. Weber, H.G. Wenzel, H. Wittgens:

Arbeitsmedizin, Thieme Verlag, Stuttgart (1979)

Valentin, H.:

Arbeitsmed., Sozialmed., Präventivmed. 17, 133 (1982)

Will, W., W. Zschiesche, K. Gossler, K.H. Schaller,
H. Valentin:

Fresenius Z.Anal.Chem. 303, 410 (1980)

Will, W., K. Gossler, H.J. Raithel, K.H. Schaller:

Arbeitsmed., Sozialmed., Präventivmed. 16, 201 (1981)

Williams, R.T.:

Detoxication mechanism. The metabolism and detoxication
of drugs, toxic substances and other organic compounds.
Chapman and Hall, London 1959

Yost, R.W., L.S. Ettre, R.D. Conlon:

Practical Liquid Chromatography. An Introduction.

Perkin-Elmer (1980)

Zavon, M.R., U. Hoegg, E. Bingham:

Arch.Environ.Hlth. 27, 1 (1973)

Zschiesche, W., K. Gossler, K.H. Schaller, G. Triebig,
D. Weltle, J. Angerer:

Berufskrankheiten in der keramischen und Glas-Industrie.
Biochemische Methoden zur Überwachung Styrol-exponierter
Personen 26, 16

Hrsg. Berufsgenossenschaft der keramischen u. Glas-Industrie,
Würzburg (1978/79)

L e b e n s l a u f

=====

31.01.1950	geboren in Tremmersdorf Vater: Dipl.Volkswirt Georg Schnödt Mutter: Maria Schnödt, geb. Kausler
1956 - 1960	Volksschule in Eschenbach
1960 - 1970	Gymnasium in Eschenbach
1970 - 1976	Studium: Englisch/Sozialkunde an der FAU-Erlangen 1973-74 Stipendium an der Kansas Univer- sity in Lawrence, Kansas USA
1976 - 1981	Studium der Zahnmedizin an der FAU-Er- langen
17. Juli 1981	Bestallung als Zahnarzt
seit Sept. 1981	Assistent bei Zahnarzt Dr. Beck in Neuburg/Donau

